

**Etablierung eines
Transformationssystems für die
Arzneipflanze *Hypericum perforatum* L.**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nora Feye

aus Stadthagen

1. Referent: Prof. Dr. L. Beerhues
2. Referent: Prof. Dr. R. R. Mendel
eingereicht am: 28.03.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.06.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag in Form eines Kurzvortrags

Feye N. und Beerhues L.: Establishment of a transformation system for *H. perforatum*.
Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 5. Vortragsreihe,
Kaub am Rhein 1.-3.10.2006

Tagungsbeiträge in Form eines Posters

Liu B., Klundt T., Bocola M., Boubakir Z., **Feye N.**, Beerhues L.: Biosynthesis of acyl- and benzoylphloroglucinols. 50 Years of the Phytochemical Society of Europe, Cambridge UK, 11.-14.04.2007

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Ludger Beerhues für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Unterstützung.

Dank an Prof. R. R. Mendel für die Übernahme des Korreferats sowie die Möglichkeit die Partikelkanone und das konfokale Laser Scanning Mikroskop zu nutzen.

Dr. Robert Hänsch danke ich für die anregenden Diskussionen sowie die Einarbeitung und Betreuung am cLSM. Außerdem bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft und sein stets offenes Ohr für jegliche Belange.

Allen Mitarbeitern der AG Beerhues danke ich für viele unterhaltsame und produktive Stunden im Labor. Besonderer Dank gilt Ines Rahaus, Torben Raeth, Susanne Kühle und Helge Scharnhop mit denen es eine besondere Freude war, nicht nur im Labor zusammenzuarbeiten, sondern hin und wieder auch den Feierabend gemeinsam zu verbringen.

Bei Dr. Gregory Franklin bedanke ich mich für die Bereitstellung von Zellkulturen und für hilfreiche Tipps zur Kultivierung.

Für ihre praktische Unterstützung und die schönen Fotos danke ich Marion Kay.

Ebenso danke ich Michael Reusche für den kurzen Exkurs in die Mikrobiologie.

An dieser Stelle sei auch allen Korrekturlesern für ihre aufmerksame Durchsicht der Arbeit gedankt.

Außerdem danke ich Henning Fruth für die Hilfe am PC und seine Geduld.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. <i>Hypericum perforatum</i> L. (Tüpfel-Johanniskraut)	1
1.1. Botanik des Johanniskrauts	3
1.2. Inhaltsstoffe	3
1.3. Wirkung von Johanniskraut-Zubereitungen	5
2. Hyperforin-Biosynthese.....	8
3. Polyketid-Synthasen (PKS)	9
3.1. Benzophenon-Synthase (BPS)	10
4. Moderne Gentechnologie und Ziel dieser Arbeit	12
II. MATERIAL UND METHODEN	15
1. Chemikalien, Medien und Puffer	15
1.1. Chemikalien	15
1.2. Medien zur Pflanzen- und Bakterienkultur	15
1.2.1. Medien für die <i>in vitro</i> -Kultur.....	16
1.2.2. Antibiotika-Stammlösungen.....	17
1.2.3. Phytohormone	17
1.2.4. Medien für die Bakterienkultur	18
1.3. Puffer und sonstige Lösungen.....	18
1.3.1. Lösungen für die Gelelektrophorese	19
1.3.2. Puffer zur Plasmid-und DNA-Isolierung:	20
1.3.3. Lösungen und Medien für Protoplasten	21
1.4. Oligonucleotide.....	22
1.5. Enzyme.....	22
1.6. Kits für die Molekularbiologie	23

2. Geräte	23
3. Pflanzenmaterial	24
3.1. In vitro-Kultur von <i>Hypericum perforatum</i>	24
3.2. Sprosskulturen von <i>H. perforatum</i>	24
3.3. <i>H. perforatum</i> -Kalluskulturen.....	25
3.4. Suspensionskultur von <i>H. perforatum</i> cv. Helos	25
3.5. Sterile <i>H. perforatum</i> Keimlinge	26
4. Bakterienkulturen und Plasmide	26
4.1. <i>E. coli</i> -Stämme	26
4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme zum Gentransfer	26
4.3. Vektoren	27
4.4. Anlegen einer Glycerolkultur	27
5. Klonierungstechniken.....	28
5.1. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	28
5.1.1. Klonierung mit dem pGEM®-T-Easy Vektor System (Promega, Heidelberg).....	28
5.2. Transfer von Plasmiden in DH5 α	29
5.2.1. Transformation mittels Hitzeschock	29
5.2.2. Transformation mittels Elektroporation	29
5.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	30
5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
5.5. Plasmid-Isolierung aus Bakterienzellen	30
5.5.1. Isolierungen mit Kits.....	31
5.5.2. Minipräparation nach dem QUIAGEN Plasmid Purification Handbook (Puffer P1-3).....	31
5.5.3. CTAB-Minipräparation (modifiziert nach Del Sal <i>et al.</i> , 1989).....	31
5.6. Isolierung der Gesamt-DNA aus Agrobakterien.....	32
5.7. Photometrische Bestimmung der Plasmidkonzentration	32
5.8. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	33
5.9. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33

5.10. Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377	35
5.10.1. Probenvorbereitung	35
5.10.2. Sequenziergel	36
5.10.3. Auswertung der Sequenzierung	37
6. Transformationsmethoden	37
6.1. Indirekter Gentransfer mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
6.1.1. Triple mating (Plasmidmobilisierung in <i>Agrobacterium</i>).....	37
6.1.2. Infektion der Blätter und Regeneration von Sprossen	38
6.1.3. Internodien-Transformation:	39
6.1.4. Modifikationen der Transformation	39
6.2. Infiltration mit Agrobakterien.....	42
6.3. Protoplastentechnik	42
6.3.1. Isolierung von Protoplasten aus <i>H. perforatum</i>	42
6.3.2. Transformation von Protoplasten mit PEG	43
6.4. Transformation mittels Partikelkanone	43
6.4.1. Beladen der Goldpartikel (Coating)	44
6.4.2. Vorbereitung der Blätter und Internodien	45
6.4.3. Vorbereitung der Helos-Suspensionskultur	46
6.4.4. Kanonenbedienung	46
6.4.5. Selektion putativ transformierter Zellen	46
6.4.6. Regeneration von Sprossen aus Suspensionskultur	47
7. Detektion transformierter Zellen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop.....	47
7.1. Grün fluoreszierendes Protein (GFP).....	47
7.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM 510 META)	48
8. Sonstige Techniken.....	49
8.1. Test auf bakteriostatische Wirkung	49
8.2. Untersuchung auf Endonukleaseaktivität.....	49
8.2.1. Herstellung der Probelösung	49
8.2.2. Endonukleasetest	50
8.3. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	50

III. ERGEBNISSE	51
1. Transformation von <i>H. perforatum</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	51
1.1. Erstellung des Binärvektors pBIN19 mit dem Benzophenon-Synthase-Gen.....	51
1.2. Regeneration von Sprossen und Selektion.....	53
1.2.1. Variationen der Cokultivierung und Regeneration	54
2. Isolierung und Transformation von Protoplasten.....	57
2.1. Protoplastenisolation aus <i>H. perforatum</i> -Blättern	57
2.2. Detektion transformierter Protoplasten	57
3. Biolistische Transformation	58
3.1. Amplifizierung der BPS für die Fusion mit GFP	58
3.2. Klonierung der Vektoren zur Fusion von GFP mit BPS	60
3.3. Transformation mit der Partikelkanone und Detektion im cLSM.....	63
3.3.1. Transformation von <i>N. tabacum</i>	64
3.3.2. Transformation von <i>H. perforatum</i> mit verschiedenen Plasmiden	67
3.3.3. Beschuss von Internodien.....	71
3.3.4. Arbeiten an einer Zellkultur von <i>H. perforatum</i> cv. Helos	71
4. Wirkung von <i>H. perforatum</i>-Extrakten auf Agrobakterien	74
5. Untersuchung auf Endonuklease-Aktivität.....	75
IV. DISKUSSION.....	77
1. Gentransfer in Pflanzen	77
1.1. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer.....	78
1.2. Direkter Gentransfer durch Mikroprojektile	82
2. Gentransfer in <i>H. perforatum</i>	84

3. Hyperforin und Hypericin	85
3.1. Antibakterielle Wirkung von Hyperforin	86
3.2. Hyperforin-Biosynthese in <i>Hypericum</i> -Arten	87
3.3. Manipulation der Hyperforin-Biosynthese	89
 V. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
 VI. ANHANG	92
1. Basensequenz der Benzophenon-Synthase aus <i>H. androsaemum</i>	92
2. Ergebnis der Sequenzierung des Fusionsgens BPS-GFP	92
 VII. LITERATUR	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Hypericum perforatum</i> L. (Foto: P. Klingauf)	2
Abb. 2: <i>H. perforatum</i> -Blatt mit Sekretbehältern.....	2
Abb. 3: R=H Hyperforin, R=CH ₃ Adhyperforin	4
Abb. 4: R ₁ =R ₂ =CH ₃ Hypericin	4
Abb. 5: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir <i>et al.</i> , 2005)	8
Abb. 6: Reaktionen von drei Typ III-Polyketid-Synthasen in <i>Hypericum</i> -Arten (Klingauf <i>et al.</i> , 2005).	10
Abb. 7: Beispiele pharmakologisch aktiver Benzophenon-Derivate und ihre biogenen Beziehungen (Liu <i>et al.</i> , 2003)	12
Abb. 8: Biosynthese von Hyperforin aus Isobutyrophenon in Wildtyp-Pflanzen (oben) und postulierte Bildung eines Derivats aus Phlorbenzophenon in transgenen Linien, die BPS konstitutiv exprimieren (unten)	14
Abb. 9: Suspensionskultur <i>H. perforatum</i> cv. Helos	25
Abb. 10: Blattscheiben (oben) und Internodien (unten) von <i>H. perforatum</i> am ersten Tag der Regeneration.	39
Abb. 11: Schema der Partikelkanone nach Sanford.....	44
Abb. 12: Karte des pUC-basierten Vektors pCK:BPS mit dem doppelten 35S- Promotor	52
Abb. 13: Binärvektor pBIN19 mit rechter und linker Grenze (LB und RB) sowie lacZ-Gen mit multipler Klonierungsstelle.....	52
Abb. 14: Regeneration von Sprossen aus Internodien (links) und Blattscheiben (rechts) drei Wochen nach der Transformation mittels <i>A. tumefaciens</i> auf Regenerationsmedium ohne Selektion.	53
Abb. 15: Primer zur Amplifizierung der BPS mit Restriktionssequenzen zur Ligation in die Fusionsvektoren pBSK:GFP-N und -C. a) GFP-FUSforw mit der <i>Nco</i> I Schnittstelle. b) C-FUSrev mit <i>Bgl</i> II Schnittstelle. c) N-FUSrev mit <i>Bgl</i> II Schnittstelle und Glycin-Triplett anstelle des Stopcodons.....	59
Abb. 16: Amplifikate der <i>bps</i> mit den Fusinsprimern aus pCK:BPS, M: DNA-Leiter.	60

Abb. 17: Genkassette der C-Fusion aus <i>gfp</i> und <i>bps</i> mit den Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle.	63
Abb. 18: pBSK:GFP-Fusionsvektoren mit multipler Klonierungsstelle, die unten jeweils vergrößert dargestellt ist. (nach Nowak <i>et al.</i> , 2004).....	63
Abb. 19: <i>N. tabacum</i> -Epidermiszelle drei Tage nach Cotransformation mit pBSK:GFP-BPS-C3 und pRTL:DsRed. A: Chlorophyllautofluoreszenz, B: Fluoreszenz des GFP im Cytoplasma, C: Hellfeld, D: DsRed-Fluoreszenz, E: A-D überlagert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einer Laserleistung von 6 % und bei 543 nm mit 49 % für DsRed. Detektion mit dem LSM 510 META, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr.....	65
Abb. 20: Die in Abb. 8 gezeigte transformierte Epidermiszelle bei verschiedenen Emissions-Wellenlängen Anregung mit 488 nm bei 6 % Laserleistung und mit 543 nm mit 49 % Laserleistung. Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr	66
Abb. 21: Epidermiszelle von <i>N. tabacum</i> im cLSM, 3 Tage nach Transformation mit GFP-BPS-C3/dsRed. Das Cytoplasma wie auch der Zellkern zeigen grüne Fluoreszenz. Die Fluorochromanregung erfolgte mit 488 nm und 8 % Laserleistung. Detektion im LSM 510 META, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr.....	67
Abb. 22: Spaltöffnung von <i>N. tabacum</i> im cLSM. Die obere Zelle ist mit GFP-BPS-N2 transformiert. Im Zellkern und im Cytoplasma ist die Fluoreszenz des GFP zu erkennen. Fluorochromanregung erfolgte mit 488 nm und einer Laserleistung von 6 %, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr.....	67
Abb. 23: GFP-markierte Peroxisomen in einer Spaltöffnungszelle von <i>H. perforatum</i> nach Transformation mit pFF:GFP-PTS1. Anregung mit 488 nm und 12 % Laserleistung, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr.....	68
Abb. 24: Epidermiszelle mit GFP-markierten Peroxisomen in einem <i>H. perforatum</i> -Blatt. A: Chlorophylleigenfluoreszenz, B: GFP in den Peroxisomen, C: Hellfeld D: A-C überlagert. Anregung mit 488 nm bei 12 % Laserleistung, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr.....	69
Abb. 25: Emissionsspektrum eines GFP-markierten Peroxisoms in einer Schließzelle von <i>H. perforatum</i> , Anregung der Fluorochrome erfolgte mit 488 nm und einer Laserleistung von 6 %, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr, Auswertung mit dem LSM 510 META	70

Abb. 26: GFP-markierte Peroxisomen und eigenfluoreszierende Chloroplasten in kultivierten Zellen von <i>H. perforatum</i> cv. Helos. Fluorochromanregung mit 10 % Laserleistung bei 488 nm, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3	72
Abb. 27: GFP-markierte Peroxisomen in einer Zelle der Suspensionskultur von <i>H. perforatum</i> cv. Helos. Anregung mit 488 nm bei einer Laserleistung von 10 %, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3.....	72
Abb. 28: Spektrale Signatur der Fluoreszenz in Peroxisomen einer kultivierten Zelle von <i>H. perforatum</i> cv. Helos nach Transformation mit pFF:PTS1-GFP. Fluorochromanregung mit 488 nm bei 9,9 % Laserleistung, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3.....	73
Abb. 29: Regeneration von Sprossen aus kultivierten Zellaggregaten von <i>H. perforatum</i> cv. Helos sechs Wochen nach Transformation mit pRT99/KanR.....	74
Abb. 30: Hemmtest mit methanolischem Auszug aus <i>H. perforatum</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	75
Abb. 31: Endonucleasetest Neg: 3 µl desungeschnittenen Vektors pBSK:GFP-BPS-C4, N.t.: 3 µl Vektor mit 25 µg Rohprotein aus <i>N. tabacum</i> -Blättern, H.p.: 3 µl Vektor mit Rohprotein aus <i>H. perforatum</i> -Blättern. M: DNA-Leiter.....	76
Abb. 32: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006).....	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pharmazeutisch relevante Inhaltsstoffe von <i>H. perforatum</i> und ihre Wirkungen	5
Tab. 2: Verwendete Geräte und Apparaturen	23
Tab. 3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	26
Tab. 4: Verwendete <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme	26
Tab. 5: Plasmide.....	27
Tab. 6: Antimikrobielle Aktivität von Hyperforin gegen Bakterien und Pilze (Reichling <i>et al.</i> , 2001). MIC = minimale inhibitorische Konzentration.	87

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxydisulfid
BDS	modifiziertes B5-Medium, nach Dunstan und Short (1977)
bp	Basenpaare
BPS	Benzophenon-Synthase
BSA	Rinderserumalbumin
BUS	Isobutyrophenon-Synthase
CHS	Chalkon-Synthase
CoA	Coenzym A
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
GFP	Green fluorescent protein
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
H.p.	<i>Hypericum perforatum</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LS	Linsmeier und Skoog
MAO	Monoamin-Oxidase
min	Minute
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
U	Unit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid
YFP	Yellow fluorescent protein

I. Einleitung

1. *Hypericum perforatum* L. (Tüpfel-Johanniskraut)

Schon Dioskurides (77 n. Chr.) beschrieb die wundheilungsfördernde, antipyretische und diuretische Wirkung eines Krautes, das er als „hypereikon“ bezeichnete (Czygan, 1993). Im Mittelalter bekam dieses dann unter anderem Bezeichnungen wie Teufelsflucht, Jageteufel oder Hexenkraut, die in gewisser Weise schon auf die heute bekannte Wirkung gegen Depressionen hindeuten. Es wurde wegen seiner angeblichen Wirkung gegen Dämonen und böse Geister verwendet. 1525 beschrieb Paracelsus in seinem Buch „Von den natürlichen Dingen“ als einer der ersten die pharmakologischen Eigenschaften des Johanniskrauts in wissenschaftlicher, rationaler Weise. Er erkannte den lindernden Einfluss auf Menschen mit Verzweiflung und Trübsinn. Seit dieser Zeit wurde die Pflanze immer mehr zu psychotherapeutischen Zwecken eingesetzt, was die Empfehlungen in alten Kräuterbüchern belegen. Der wissenschaftliche Name *Hypericum perforatum*, wie wir ihn heute gebrauchen, wurde von Carl von Linné 1753 in seinem Werk „Species plantarum“ aufgeführt. Der Gattungsname leitet sich von hyper = auf, über und ereikon = Heide ab und bedeutet „auf der Heide wachsendes Kraut“ oder auch „größer als Heide wachsendes Kraut“ (Hölzl *et al.*, 1994). Der Artname deutet auf die Erscheinung der Blätter hin, die gegen das Licht gehalten perforiert erscheinen. Sie sind durchsetzt mit großen schizogenen Öldrüsen, die mit ätherischem Öl gefüllt sind.



Abb. 1: *Hypericum perforatum* L. (Foto: P. Klingauf)

Die deutsche Bezeichnung Johanniskraut bezieht sich auf die Blütezeit, die um den Geburtstag Johannes des Täufers (24.06.) beginnt, und zeigt die enge Verbindung der Medizin in früherer Zeit mit religiösen Mythen. Der 21. Juni ist der Tag der Sommersonnenwende, weshalb das gelb blühende Kraut (**Abb.1**) zur Zeit der Germanen unter anderem mit Licht und Sonne assoziiert wurde. Daraus leiteten die Menschen schon damals eine heilende Wirkung gegen Schwermütigkeit ab und glaubten, die Pflanze sei in der Lage in den scheinbar durchlöcherten Blättern die Kraft des Lichtes zu sammeln und an die Kranken wieder abzugeben. Sie erkannten somit auf Umwegen die heute wissenschaftlich erwiesene Wirkung des Johanniskrauts.



Abb. 2: *H. perforatum*-Blatt mit Sekretbehältern

1.1. Botanik des Johanniskrauts

Zur Gattung *Hypericum* (Familie *Clusiaceae*) gehören rund 450 Arten, von denen neun in Mitteleuropa heimisch sind. Jedoch wird nur die Art *H. perforatum* pharmazeutisch genutzt. Hierbei handelt es sich um eine ausdauernde, bis 1 m große, aufrechte Pflanze. Sie wächst auf magerem Boden, an Wegrändern, Böschungen, Äckern und Wiesen und ist hier oft als Pionierpflanze anzutreffen. Die Blütezeit reicht von Juni bis August. Der mit zwei Längskanten ausgestattete Stängel ist hart, worauf sich die volkstümliche Bezeichnung Hartheu bezieht. An ihm sind die elliptischen Blätter gegenständig angeordnet. Auf der Blattfläche verteilt erkennt man, gegen das Licht gehalten, die typischen durchscheinenden, mit ätherischem Öl gefüllten Drüsen (**Abb. 2**). Vornehmlich an den Rändern der Blätter befindet sich ein zweiter Typ von Sekretbehältern. Diese erscheinen dunkelrot bis schwarz und kommen in großer Zahl auch in den Blütenblättern vor. Die fünfblättrigen Blüten sind in einer Trugdolde angeordnet. Beim Zerreiben der gelben Blütenblätter tritt der rote Inhalt der Ölbehälter aus. Hierauf beziehen sich die volkstümlichen Namen Blutkraut, Johannisblut und Herrgottsblut. Bei dem roten Pigment handelt es sich um Hypericin.

Neben dem Tüpfel- oder auch Echtem Johanniskraut (*H. perforatum*) kommen in Deutschland unter anderem *H. hirsutum* (Behaartes Johanniskraut), *H. maculatum* (Geflecktes Johanniskraut) und *H. androsaemum* (Mannsblut) vor, sowie zahlreiche eingeführte Arten als dekorative Gartenpflanzen.

1.2. Inhaltsstoffe

H. perforatum zählt heute zu den bestuntersuchten Arzneipflanzen. Es enthält zahlreiche pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe. Im Tüpfel-Johanniskraut finden sich neben den beiden charakteristischen Verbindungen Hyperforin und Hypericin auch Flavonoide, ätherisches Öl und Xanthone (**Tab. 1**).

Hyperforin (**Abb. 3**) ist ein polyprenyliertes bizyklisches Acylphloroglucinol-Derivat mit antidepressiver, antibakterieller sowie krebs- und entzündungshemmender Wirkung. Die höchsten Hyperforingehalte wurden in Blüten und Früchten gefunden. Es akkumuliert in der Blüte im Stempel (Repčák und Mártionfi, 1997) und der Gehalt steigt während der

Fruchtreife von 2,5 % auf bis zu 8,5 % an (Tekel'ová *et al.*, 2000). Damit dient Hyperforin dem Schutz der sich entwickelnden Samen vor mikrobiellem Befall und Fressfeinden.

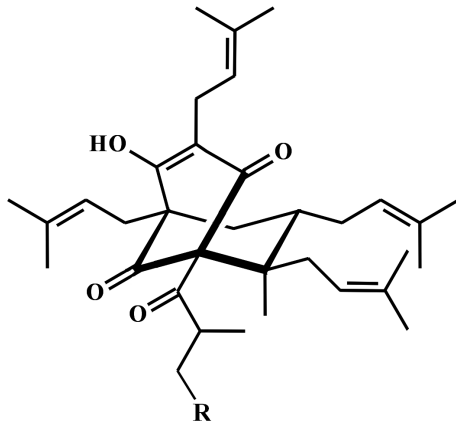


Abb. 3: R=H Hyperforin, R=CH₃ Adhyperforin

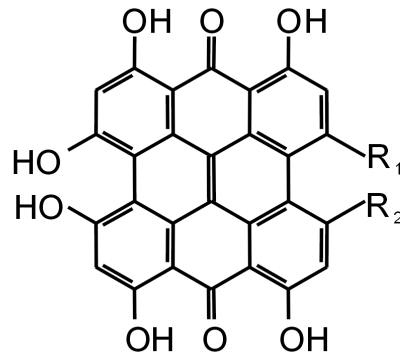


Abb. 4: R₁=R₂=CH₃ Hypericin,
R₁=CH₃ R₂=CH₂OH Pseudohypericin

Der wohl auffälligste Inhaltsstoff des Johanniskrauts ist der rote Farbstoff Hypericin, ein Naphthodianthron (**Abb. 4**). Er ist ein starker Photosensibilisierer und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 588 nm. Die photometrische Bestimmung des Hypericins dient u.a. der Qualitätskontrolle von Johanniskrautzubereitungen. Lokalisiert ist die wasserunlösliche Verbindung in den dunkelroten bis schwarzen Sekretbehältern vor allem in Knospen und Blüten, aber auch in den Blättern. Die biologische Bedeutung der Dianthrone wird auf ihre photodynamischen Eigenschaften zurückgeführt (Diwu, 1995).

Hypericin kann selektiv in Tumorzellen aufgenommen werden und dort unter UV-Licht Apoptose induzieren (photodynamische Therapie) (Agostinis *et al.*, 2002). Es besitzt zudem antivirale Wirkung, indem es die Replikation verkapselter Viren inhibiert (Meruelo *et al.*, 1989). Neben Hypericin kommt in geringer Menge das Naphthodianthron Pseudohypericin (**Abb. 4**) im Johanniskraut vor, welches schwächere Wirkung auf Viren zeigt (Vandenbogaerde *et al.*, 1998).

Tab. 1: Pharmazeutisch relevante Inhaltsstoffe von *H. perforatum* und ihre Wirkungen

Stoffgruppe	Beispiel	Wirkung
Acylphloroglucine	Hyperforin, Adhyperforin	antidepressiv, antibakteriell, antitumoral, antiinflammatorisch
Naphthodianthrone	Hypericin, Pseudohypericin	antidepressiv, antiviral, antitumoral photosensibilisierend
Flavonoide	Quercetin und Glykoside	antidepressiv
Xanthone	1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Kielcorin	antidepressiv
Ätherisches Öl	Terpene	sedativ

Den Flavonoiden in *H. perforatum* wird ebenfalls antidepressive Wirkung zugeschrieben. Vor allem Rutin scheint in diesem Zusammenhang Aktivität zu zeigen, wie Noldner und Schotz (2002) zeigen konnten. Aber auch andere Flavonoide und auch Xanthone sind möglicherweise an der Wirkung beteiligt. Obwohl der antidepressive Effekt wohl hauptsächlich vom Hyperforin ausgeht, besteht ein komplexes Zusammenspiel mit weiteren Verbindungen, die die Wirkung der Johanniskrautextrakte positiv beeinflussen.

1.3. Wirkung von Johanniskraut-Zubereitungen

Johanniskrautextrakte zeigen auf Grund des umfangreichen Inhaltsstoffspektrums eine Reihe pharmakologischer Eigenschaften.

Für die antidepressive Wirkung wurde zunächst das Hypericin verantwortlich gemacht. Es wirkt hemmend auf die Monoaminoxidase A, was auch für einige synthetische Antidepressiva gilt. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass der gewünschte Effekt erst bei Konzentrationen eintritt, die in den erhältlichen Extrakten nicht erreicht werden (Bladt und Wagner, 1994). Dagegen sind eine antivirale Wirkung und der cytotoxische Effekt auf Tumorzellen belegt (Hadjur *et al.*, 1995, Vandenbogaerde *et al.*, 1998).

Aus neueren Studien geht hervor, dass das prenylierte Phloroglucinderivat Hyperforin, möglicherweise zusammen mit einigen Flavonoiden, die Hauptwirksubstanz der Johanniskrautpräparate darstellt. Durch Erhöhung der intrazellulären Natriumionen-Konzentration im Axon (Müller *et al.*, 1999) wird die im natriumgetriebenen Symport erfolgende Wiederaufnahme verschiedener Neurotransmitter wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, L-Glutamat und GABA durch Hyperforin gehemmt (Chatterjee *et al.*, 1998, Müller *et al.*, 1997). Möglicherweise greift es an einem Natrium-Protonen-Tauscher an, was die nicht selektive Hemmung der Wiederaufnahme erklären würde. Synthetische Psychopharmaka, wie z. B. selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), hemmen kompetitiv die Aufnahme eines Typs von Neurotransmittern und erreichen damit nicht die Bandbreite von Johanniskraut.

In einer Anzahl randomisierter Doppelblindstudien ist mittlerweile eine den synthetischen Antidepressiva vergleichbare Wirkung des Johanniskrauts belegt (Vorbach *et al.*, 1997, Philipp, 1999, Wheatley *et al.*, 1997). Trotz seiner Instabilität ist Hyperforin gut bioverfügbar und nach 2-6 Stunden wird der maximale Plasmaspiegel erreicht. Die Halbwertszeit bei Menschen beträgt 15 Stunden, die des Hypericins circa 30 Stunden (Kerb *et al.*, 1996, Biber *et al.*, 1998). Es wird eine Tagesdosis von 300-900 mg Gesamtextrakt empfohlen, wobei ähnlich zu synthetischen Antidepressiva mit einer Latenzzeit von 2-3 Wochen zu rechnen ist. Präparate aus Johanniskraut sind heute fester Bestandteil der Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen und gehören zu den am häufigsten angewandten Phytopharmaka. Dabei ergeben sich aus der Behandlung mit dem pflanzlichen Arzneimittel weitere Vorteile. Die Präparate sind vergleichsweise kostengünstig und es treten wesentlich seltener Nebenwirkungen auf. Das erhöht die Akzeptanz bei den Patienten und unterstützt damit zusätzlich den Therapieerfolg.

Depressionen äußern sich durch ein tiefes Gefühl der Niedergeschlagenheit, Trauer und Antriebsarmut. Die Betroffenen ziehen sich oft wochenlang zurück, ohne einen Neuanfang zu wagen. Dabei erkranken Frauen doppelt so häufig wie Männer. Im Gegensatz zu vorübergehenden Stimmungstiefs hält die Depression über Monate und sogar Jahre an. Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt wird (leicht, mittelschwer, schwer). In jedem Fall ist die Depression therapiebedürftig. In der Praxis werden Depressionen aber oft nicht hinreichend erkannt oder adäquat behandelt, was dramatische Folgen haben kann. Schätzungen zufolge sind rund zwei Drittel der jährlich in Deutschland begangenen Suizide auf Depressionen

zurückzuführen. In den Industrienationen erkranken heute etwa 10 % der Bevölkerung an Depressionen. Schon im Jahr 2020, so eine Prognose der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO), steigt die Zahl der an Depression erkrankten Menschen sowie der daraus resultierende ökonomische Schaden auf Werte, die denen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen vergleichbar sind.

Die Ursachen der Depression sind mannigfaltig. Eine gestörte, stark belastende Lebenssituation ist häufig der Auslöser. Aber sie können auch Symptom einer körperlichen oder seelischen Krankheit sein sowie eine eigenständige psychische Krankheit, eine endogene Depression darstellen (Hörnig und Meyer-Wegener, 1998).

Es gibt einige relevante Wechselwirkungen, die vor Behandlungsbeginn mit Johanniskraut-Extrakten berücksichtigt werden müssen. Studien und Fallberichte deuten darauf hin, dass *Hypericum* die Serumkonzentration einiger gleichzeitig verabreichter Medikamente reduziert. Die dramatischsten diagnostizierten Effekte zeigten sich bei Cyclosporin (Breidenbach *et al.*, 2000), Protease-Hemmern (Piscitelli *et al.*, 2000) und Zytostatika (Mathijssen *et al.*, 2002). Diese Wechselwirkungen werden auf die Anregung der Expression von Cytochrom P450 3A4 sowie des Transporterproteins p-Glycoprotein zurückgeführt (Moore *et al.*, 2000). Bisher ist noch nicht abschließend bekannt, welche Inhaltsstoffe für diese Wirkungen verantwortlich sind.

Neben dem antidepressiven Effekt besitzt Hyperforin antibakterielle Wirkung (Gurevich *et al.*, 1971) gegen gram-positive Bakterien und multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (Schempp *et al.*, 1999, Reichling *et al.*, 2001). Dies könnte die traditionelle Anwendung von Johanniskraut-Extrakten zur lokalen Behandlung von infizierten Wunden erklären. Des weiteren hemmt es *in vitro* das Wachstum einiger Tumorzelllinien von Menschen und Ratten durch Induktion der Apoptose. Kürzlich wurde auch die antitumorale Aktivität *in vivo* gezeigt, wobei vielversprechenderweise keine Anzeichen von akuter Toxizität beobachtet wurden (Schempp *et al.*, 2002).

In der Dermatologie wird Johanniskrautöl schon lange bei Brandwunden, Myalgien und Kontusionen verwendet. Es gibt bisher nur eine kontrollierte Studie zur Anwendung von Hyperforin-standardisierter Johanniskraut-Creme bei subakuter atopischer Dermatitis (Schempp *et al.*, 2003). Die gegenüber Placebo signifikante Wirkung wird den entzündungshemmenden und antibakteriellen Eigenschaften des Hyperforins

zugeschrieben. Ansonsten berufen sich die Anwendungen auf traditionelle Erfahrungen und Analogieschlüsse aus präklinischen Studien.

2. Hyperforin-Biosynthese

Die Bildung des Hyperforinkerns wird von einer Typ III-Polyketidsynthase, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert. Bei der Reaktion kondensieren drei Moleküle Malonyl-CoA mit einem Molekül Isobutyryl-CoA. Das lineare Intermediat zyklisiert durch intramolekulare Claisen-Kondensation zum Phlorisobutyrophenon (**Abb. 6**). Diese Reaktion wurde in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Klingauf *et al.*, 2005). Das Hyperforin-Skelett wird unter Katalyse von Prenyltransferasen mehrfach prenyliert. Die letzte Alkylierung geht mit einer Zyklisierung zum bizyklischen Hyperforin einher (**Abb. 5**). Als Prenyldonor der ersten Prenylierung fungiert Dimethylallylpyrophosphat. Der erste Prenylierungsschritt wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe Beerhues aufgeklärt (Boubakir *et al.*, 2005). Interessanterweise ist die Prenyltransferase löslich und Eisen-abhängig.

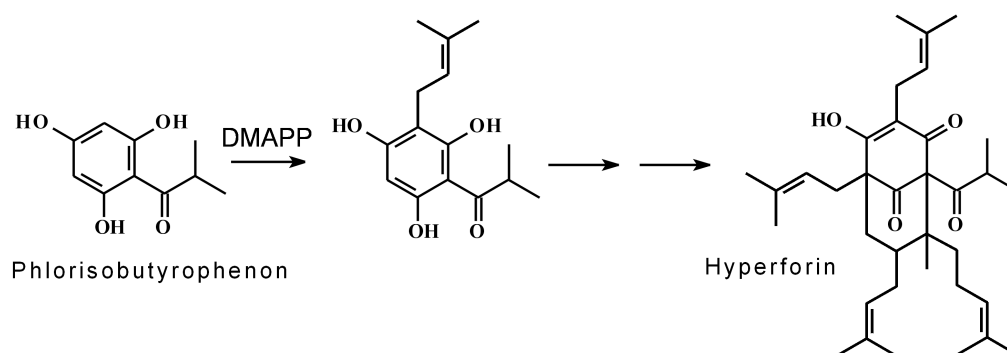


Abb. 5: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir *et al.*, 2005)

3. Polyketid-Synthasen (PKS)

Außer am Hyperforin sind Polyketidsynthasen in Pilzen, Bakterien und Pflanzen an der Bildung vieler Sekundärmetabolite mit pharmakologischen Eigenschaften beteiligt. Diese werden zum Beispiel als Antibiotika, Immunsuppressiva und Antimykotika eingesetzt. Polyketid-Synthasen lassen sich in drei große Gruppen einteilen, PKS I, PKS II und PKS III. Alle diese Enzyme stammen wahrscheinlich von den Enzymen der Fettsäurebiosynthese ab und katalysieren Reaktionen mit ähnlichen Mechanismen. Ausgehend von verschiedenen Startermolekülen erfolgt die Verknüpfung mit Acetyl-Einheiten zu Poly- β -keto-Verbindungen. Dabei sind die Substrate entweder mit CoenzymA oder dem etwa 9 kDa großen Acylcarrierprotein verestert.

Die in der Arbeitsgruppe Beerhues untersuchten Enzyme gehören den Typ III Polyketid-Synthasen an. Sie stellen eine Gruppe von homodimeren Enzymen dar, die alle Syntheseschritte an einem aktiven Zentrum pro Untereinheit katalysieren. Die Struktur des aktiven Zentrums bestimmt die Präferenz des Startermoleküls, die Anzahl der Additionen von C₂-Einheiten und die Regioselektivität der Zyklisierung. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist die Chalkon-Synthase (CHS), die ubiquitär in Pflanzen vorkommt. Ihr bevorzugtes Startersubstrat ist 4-Coumaryl-CoA, an das drei C₂-Einheiten aus Malonyl-CoA übertragen werden (**Abb. 6**). Chalkone sind die Vorstufe der Flavonoide, einer strukturell und funktionell vielfältigen Klasse pflanzlicher Sekundärmetabolite.

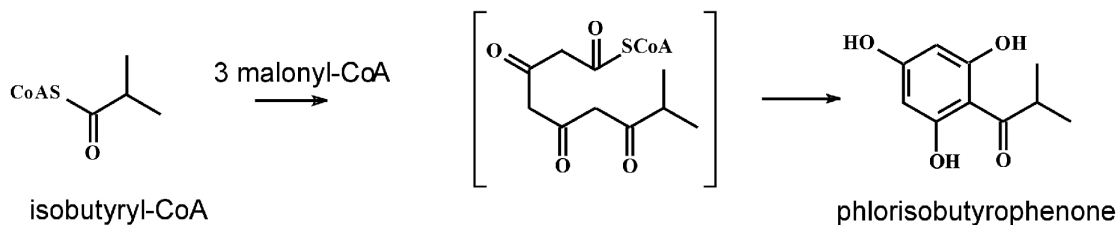
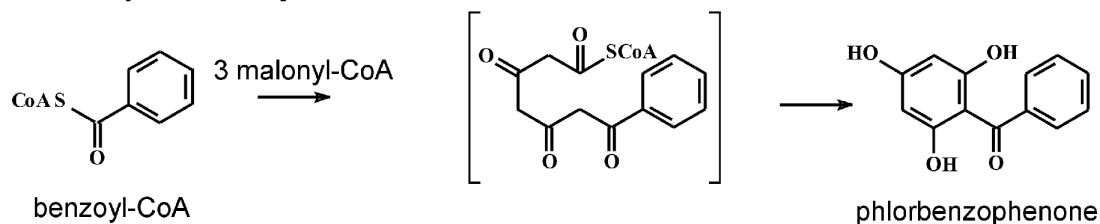
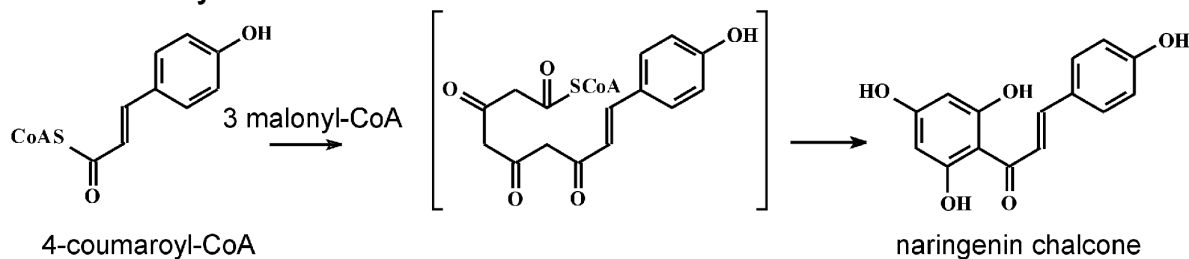
Isobutyrophenone synthase:**Benzophenone synthase:****Chalcone synthase:**

Abb. 6: Reaktionen von drei Typ III-Polyketid-Synthasen in *Hypericum*-Arten (Klingauf *et al.*, 2005)

3.1. Benzophenon-Synthase (BPS)

Eine dritte interessante Typ III-PKS aus *Hypericum*-Spezies ist die Benzophenon-Synthase. Benzophenone sind phenolische Verbindungen mit verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften (**Abb. 7**). Polyprenylierte Benzophenone wie Garcinol sind potente Hemmer von Histon-Acyltransferasen und induzieren Apoptose (Balasubramanyam *et al.*, 2004). Guttiferone zeigen anti-HIV und antimikrobielle Aktivität und die komplexen Sampsonione sind antitumoral wirksam (Matsumoto *et al.*, 2003). Einfache Benzophenone sind zudem die Vorstufen der Xanthone, die hauptsächlich in den Familien *Clusiaceae* und *Gentianaceae* verbreitet sind. Darunter finden sich Verbindungen mit cytotoxischen, antiproliferativen, virustatischen und antioxidativen Eigenschaften.

Der zentrale Schritt in der Biosynthese der Benzophenon-Derivate ist die Bildung ihres C₁₃-Gerüsts. Diese Reaktion wird von der Benzophenon-Synthase katalysiert (Liu *et al.*, 2003). Im phylogenetischen Baum mit Chalkon-Synthasen verschiedener Species und funktionell anderen PKS aus denselben Arten bilden die CHS und die CHS-ähnlichen Proteine zwei Cluster. Die BPS aus *H. androsaemum* gruppiert mit den anderen CHS-ähnlichen Proteinen zusammen, wogegen die CHS aus *H. androsaemum* im CHS-Cluster zu finden ist. Die funktionell diversen Polyketid-Synthasen anderer Arten sind ebenfalls so verteilt. Das deutet darauf hin, dass die CHS und CHS-ähnlichen Enzyme durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Das Duplikat hat eine erstaunliche funktionelle Diversifizierung in verschiedenen Taxa erfahren, während die CHS wegen ihrer wichtigen metabolischen Rolle in allen Pflanzenspezies vertreten ist (Liu *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Chalkon-Synthase sind andere Polyketid-Synthasen nicht in allen Familien vertreten.

Die BPS-cDNA aus *H. androsaemum* wurde von Liu *et al.* (2003) kloniert und charakterisiert. Heterolog exprimierte BPS ist ein Homodimer aus 42,8 kDa großen Untereinheiten. Sie katalysiert die schrittweise Kondensation eines Moleküls Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA, sowie die anschließende Zyklisierung des linearen Intermediats durch intramolekulare Claisen-Kondensation. Das resultierende 2,4,6-Trihydroxybenzophenon stellt die Ausgangsverbindung der vielen weiteren Benzophenon-Derivate und Xanthone dar.

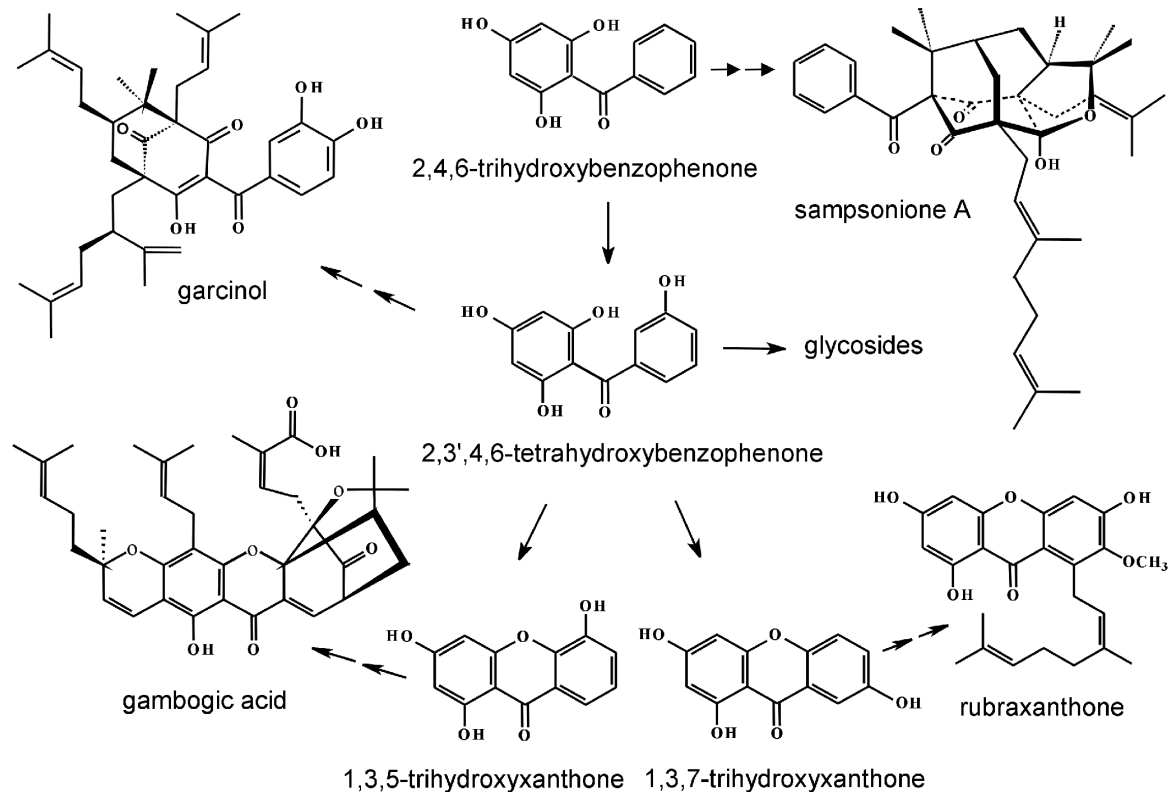


Abb. 7: Beispiele pharmakologisch aktiver Benzophenon-Derivate und ihre biogenen Beziehungen (Liu *et al.*, 2003)

4. Moderne Gentechnologie und Ziel dieser Arbeit

H. perforatum ist eine wichtige Arzneipflanze in der Behandlung von Depressionen. Ihr Inhaltsstoff Hyperforin ist strukturell wie funktionell ein neuartiges Antidepressivum. Darüber hinaus stellt es eine neue Leitstruktur für die Tumorthherapie und die Antibiotika-Gewinnung dar. Trotz der besseren Verträglichkeit von Johanniskraut-Extrakten gegenüber synthetischen Antidepressiva treten auch Nachteile und Einschränkungen in der Anwendung auf, wie z. B. die oben erwähnten Wechselwirkungen mit gleichzeitig eingenommenen Präparaten. Ziel der Arzneistoffforschung ist es allgemein, Wirkstoffe zu finden und zu optimieren. Letzteres heißt Medikamente zu entwickeln, die verträglicher und dabei nicht weniger wirksam sind als die bisher vorhandenen. Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich heute Ergebnisse erzielen, die den Anforderungen an moderne Arzneimittel entsprechen. Medizinisch genutzte Pflanzen stehen daher im Interesse der

Genforschung. Daneben sind auch landwirtschaftliche Nutzpflanzen ein Objekt der Gentechniker. Durch Einbringen neuer Gene und somit veränderter Phänotypen wird zum Beispiel versucht, die Erträge und Anpassungsfähigkeit an Extremstandorte zu steigern und Ernteaussfällen durch Schädlinge vorzubeugen. Dabei ist gerade bei den ernährungsrelevanten Getreiden die Transformation erst nach Jahren der Forschung gelungen (Van Wordragen und Dons, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nach einem Weg gesucht werden, um *H. perforatum* zu transformieren. Dieses Vorhaben verfolgt auf lange Sicht verschiedene Ziele. Zum einen ermöglicht es, die Regulation der Hyperforin-Biosynthese und anderer Wege in transgenen Johanniskraut-Linien zu untersuchen. Zum anderen erlaubt es die gezielte Beeinflussung der Hyperforin-Biosynthese. Hieraus könnten Derivate resultieren, die der pharmakologischen Aktivität der Muttersubstanz ähneln, aber keine Wechselwirkungen mehr induzieren. Das würde zweifelsohne den Einsatz der Heilpflanze im Interesse der Patienten weiter verbessern. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Hyperforin chemisch nicht zugänglich ist (Nicolaou *et al*, 2005). Als ein erster Schritt in Richtung „metabolic engineering“ wurde die Transformation von *H. perforatum* mit BPS gewählt. Konstitutiv exprimierte BPS kann möglicherweise in allen Geweben Phlorbenzophenon verfügbar machen, welches dann zu dem in **Abb. 8** dargestellten Hyperforin-Derivat umgesetzt werden könnte. Allerdings ist über die Substratspezifität der beteiligten Prenyltransferasen zur Zeit noch wenig bekannt.

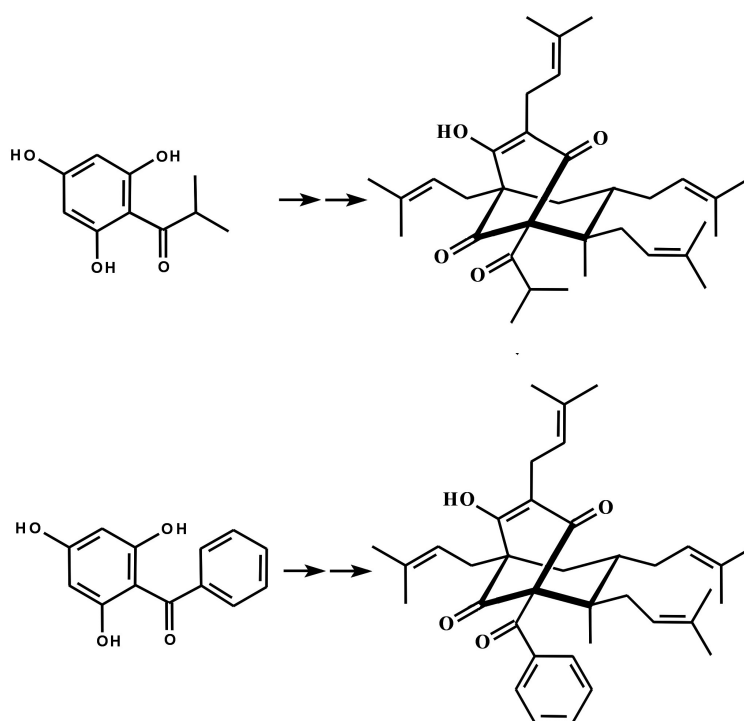


Abb. 8: Biosynthese von Hyperforin aus Isobutyrophenon in Wildtyp-Pflanzen (oben) und postulierte Bildung eines Derivats aus Phlorbenzophenon in transgenen Linien, die BPS konstitutiv exprimieren (unten)

II. Material und Methoden

1. Chemikalien, Medien und Puffer

1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon)	Fluka
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra	Roth
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Roth
D-Glucose	Fluka
DMSO	Fluka
IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid)	Sigma Aldrich
Mannit	Serva
Select Peptone	Life Technologies
Select Yeast Extract	Life Technologies
X-Gal	Sigma Aldrich
Formamid	Sigma Aldrich
Acrylamid	Gibco-BRL
Bis-Acrylamid	Gibco-BRL
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad
SDS	Roth

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.A.- oder HPLC-Qualität verwendet.

1.2. Medien zur Pflanzen- und Bakterienkultur

Alle Medien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und der pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven für 20 min

bei 121 °C und einem Druck von 2 bar. Temperaturempfindliche Bestandteile (z. B. Antibiotika) wurden sterilfiltriert und dem Medium nachträglich zugegeben.

1.2.1. Medien für die *in vitro*-Kultur

Bezeichnung	Zusammensetzung		Lagerung
<i>20× MS-Makro-Salze:</i>	NH ₄ NO ₃	33,0 g/l	4 °C
	KNO ₃	38,0 g/l	
	MgSO ₄ × 2H ₂ O	7,4 g/l	
	CaCl ₂ × 2H ₂ O	8,8 g/l	
	KH ₂ PO ₄	3,4 g/l	
<i>1000× MS-Mikro-Salze:</i>	H ₃ BO ₃	6,2 g/l	4 °C
	MnSO ₄ × H ₂ O	16,9 g/l	
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6 g/l	
	KJ	0,83 g/l	
	Na ₂ MoO ₄	0,25 g/l	
	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025 g/l	
	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025 g/l	
<i>200× Fe-EDTA:</i>	NaFe(III) EDTA	7,46 g/l	4 °C
MS-Medium:	Saccharose	30 g	RT
	20× MS-Makro-Salze	50 ml	
	1000× MS-Mikro-Salze	1 ml	
	200× Fe-EDTA	5 ml	
	1000× MS-Vitamine	1 ml	
	pH 5,8 einstellen		
	auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, Agar 1-1,2 %		
Cokultivierungsmedium:	MS-Medium wie oben beschrieben		RT
	BAP	1mg/l	
	NAA	2 mg/l	

Regenerationsmedium:	MS-Medium wie oben beschrieben	RT
	BAP 0,1 mg/l	
	NAA 0,02 mg/l	
	(Cefotaxim 200 mg/l)	
	Agar 0,8 %	
MS-Helos:	Flüssiges MS-Medium	RT
	Saccharose 30 mg/l	
	NAA 0,5 mg/l	

1.2.2. Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung
Ampicillin	50 mg/ml dH ₂ O
Kanamycin	50 mg/ml dH ₂ O
Rifampicillin	50 mg/ml DMSO
Gentamycin	20 mg/ml dH ₂ O
Carbenicillin	100 mg/ml dH ₂ O
Claforan	100 mg/ml dH ₂ O
Streptomycin	100 mg/ml dH ₂ O
Sterilfiltrieren, in 1 ml-Aliquots aufteilen und bei -20°C lagern	

1.2.3. Phytohormone

Phytohormon	Bezugsquelle
NAA (1-Naphthylacetic acid)	Fluka
BAP (6-Benzylaminopurin)	Acros
2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acid)	Fluka
GA (Gibberellic acid)	Fluka
IBA (3-Indolbutyric acid)	Acros

Die Hormone werden zu je 1 mg/ml in 100% Ethanol gelöst und bei 4 °C gelagert.

1.2.4. Medien für die Bakterienkultur

Medium	Zusammensetzung	Lagerung
LB-Medium: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Pepton aus Casein 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,0 – 7,2 einstellen Festmedium: 15 g/l Bacto Agar	RT
YEB:	Rinder-Extrakt 5 g/l Hefe-Extrakt 1 g/l Pepton 5 g/l Saccharose 5 g/l MgSO ₄ (2mM) 0,49 g/l Festmedium: 15 g/l Bacto Agar	RT
SOC:	Bacto-Pepton 2 g Hefe-Extrakt 0,5 g 1 M NaCl 1 ml 1 M KCl 0,25 ml in 97 ml dH ₂ O lösen nach dem Autoklavieren dazugeben: 2 M Mg ⁺ -Stammlösung 1 ml 2 M Glucose 1 ml dH ₂ O ad 100ml	-20 °C
2 M Mg ⁺ -Stammlösung:	MgCl ₂ ×6H ₂ O 20,33 g MgSO ₄ ×7H ₂ O 24,65 g dH ₂ O ad 100 ml sterilfiltrieren	4 °C

1.3. Puffer und sonstige Lösungen

IPTG-Lösung:	IPTG 6 g dH ₂ O ad 500 ml
X-Gal:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid 100 mg N,N'-Dimethylformamid 2 ml

Kalium-Phosphat-Puffer:	KH_2PO_4	0,1 M
(KPi-Puffer)	K_2HPO_4	0,1 M
	K_2HPO_4 vorlegen, KH_2PO_4 zugeben, bis pH 7,5 erreicht ist	

Bradford-Reagenz:	Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
	95 % Ethanol	50 ml
	85 % Phosphorsäure	100 ml
	auf 1 l auffüllen und durch Whatman Papier filtern	

1.3.1. Lösungen für die Gelelektrophorese

Puffer zur DNA-Auftrennung:

6× Gel-Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	4 °C
	Xylencyanoblau	0,25 % (w/v)	
	Glycerol	30,0 % (w/v)	
	EDTA	10 mM	

50xTAE:	Tris	2 M	RT
	EDTA	0,05 M	
	Mit Eisessig auf pH 8 einstellen		

TBE-Puffer:	Tris	90 mM	RT
	Borsäure	90 mM	
	EDTA	2 mM	

Lösungen zum Sequenzieren:

Ladepuffer:	25 mM EDTA	1 ml	4 °C
	Formamid	5 ml	
	Dextranblau	0,1 mg	

Sequenziergel:	Harnstoff	9 g
	10xTBE-Puffer	3,0 ml
	dH ₂ O	11,5 ml
	30 % Acrylamid	3,75 ml
	TEMED	0,01 ml
	10 % (w/v) APS	230 µl

1.3.2. Puffer zur Plasmid-und DNA-Isolierung:

Puffer P1:	Tris-HCl	50 mM	RT
	EDTA	10 mM	
	sterilfiltrieren		
	pH 8,0		
	RNase A	100µg/ml	
Puffer P2:	NaOH	0,2 M	RT
	SDS	1 % (w/v)	
Puffer P3:	Kaliumacetat	2,55 M	
	pH 5,5		
3 M Na-Acetat: pH 6,5 bzw. 4	Na-Acetat	40,8 g	
	in 50 ml Wasser lösen,		
	pH mit Eisessig einstellen,		
	autoklavieren		
TE-Puffer:	Tris-HCl	10 mM	RT
	EDTA	1 mM	
	pH 8		
STET-Lysis-Puffer:	Saccharose	8 g	4 °C
	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	
	EDTA (pH 8,0)	50 mM	
	Triton X-100	0,1 %	
	in 100 ml dH ₂ O lösen		
CTAB-Puffer:	CTAB (5 %)	5,0 g	RT
	NaCl (0,2 M)	1,17 g	
	In 100 ml dH ₂ O lösen,		
	autoklavieren		
Agrobakterien-DNA Expuffer:	Tris-HCl	110 mM	RT
	EDTA	55 mM	
	NaCl	1,54 M	
	CTAB	1,1 %	
	pH 8,0		

1.3.3. Lösungen und Medien für Protoplasten

Protoplasts basal salts: (PBS)	KH ₂ PO ₄	27,2 mg/l	RT
	KNO ₃	101 mg/l	
	MgSO ₄ ×5H ₂ O	246 mg/l	
	KJ	0,16 mg/l	
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025 mg/l	
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	1480 mg/l	
PBSOs:	PBS		RT
	Mannitol	13 %	
	pH 5,8		
PBSOsE:	PBSOs		
	Cellulase Onozuka	0,5 %	
	Macerozym R10	1 %	
MSM:	MS-Makro-Salze		RT
	MS-Mikro-Salze		
	MS-Vitamine		
	Saccharose	3 %	
	Mannitol	10 %	
	pH 5,8		
	nach dem Autoklavieren dazugeben:		
	GA	1 mg/l	
	NAA	0,1 mg/l	
	Evtl. 1,2 % Agar		

1.4. Oligonucleotide

Die Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben und synthetisiert.

h5bps2	5'-atg gcc ccg gcg atg gag tac tca ac-3'
3hbps2	5'-ggg gta cct cac tgg aga att ggg aca cta tgg-3'
lacZ-fwd	5'-agt cac gac gtt gta aaa gca cgg-3'
lacZ-rev	5'-tat gtt gtg tgg aat tgt gag cgg-3'
C-FUSrev	5'-tag atc ttc act gga gaa ttg gga cac tct gca g-3'
N-FUSrev	5'-tag atc ttc cct gga gaa ttg gca cac tct gga gga c-3'
GFP-FUSforw	5'-cca tgg ccc cgg cga tgg agt ac-3'
SP6	5'-gat tta ggt gac act ata gaa tac-3'
T7	5'-gaa ttg taa tac gac tca cta tag-3'

1.5. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Peqlab, MBI Fermentas
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas
Cellulase "Onozuka" R-10	Serva
Mazerozym R-10	Serva
Lysozym	Roth
Restriktionsenzyme	
<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Nco</i> I, <i>Bgl</i> II,	MBI Fermentas, New England
<i>Sph</i> I	Biolabs

1.6. Kits für die Molekularbiologie

E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
DNeasy MiniPlant	Quiagen
Nucleospin Extract II	Macherey & Nagel
Nucleospin Plasmid	Macherey & Nagel
DNA Extraktionskit	MBI Fermentas
BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

2. Geräte

Tab. 2: Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Vapoklav	Sterilco
Heizgeräte	Dri-Block DB 3D	Techne
	Exatherm U3	Julabo
	Wasserbad	Köttermann
Spannungsgeber	Standard Power Pack P25	Biometra
	Power Pac 300	Bio Rad
Geldokumentation	Multimage™Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Thermocycler	T-Personal	Biometra
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pH-Meter	pH 325	WTW
Schüttler	HT	Infors
Waagen	Analysen- und Feinwaage	Sartorius

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Universal 32 R	Hettrich
	Biofuge 13	Heraeus, Hannover, Deutschland
Sequenzierer	ABI Prism377	Perkin Elmer
Sterilwerkbänke	LiminAir HLB 2472	Heraeus, Hannover, Deutschland
	Heraeus Instruments HBB 2460	Heraeus, Hannover, Deutschland
Partikelkanone	Biolistics PDS-1000	DuPont
Reinstwasser	Millipore	Millipore
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	cLSM 510 META	Zeiss, Göttingen, Deutschland

3. Pflanzenmaterial

3.1. In vitro-Kultur von *Hypericum perforatum*

Die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Kulturen von *Hypericum perforatum* wurden bereits früher in der Arbeitsgruppe Beerhues von Dr. Benye Liu etabliert. Die Pflanzen wurden in Erlenmeyerkolben auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) steril kultiviert. Im Kultorraum herrschten konstant 24 °C, bei einem 16 Stunden hell und 8 Stunden dunkel Rhythmus. Durch Überführen der Sprossspitzen auf frisches Medium alle drei bis vier Monate können die Pflanzen vermehrt und erhalten werden.

3.2. Sprosskulturen von *H. perforatum*

In Erlenmeyerkolben mit 20 ml flüssigem MS-Medium mit Phytohormonen wurden Sprosskulturen auf dem Schüttler unter den selben Licht- und Temperaturbedingungen wie die Pflanzenkulturen (3.1) gehalten. Die Zugabe der Hormone verhinderte das Auswachsen der Sprosse, die in dichten Bulken wuchsen. Nach zwei bis drei Wochen wurde das Medium durch frisches ersetzt.

3.3. *H. perforatum*-Kalluskulturen

Auf festem LS-Medium wurden Kalli von Johanniskraut ebenfalls in einem 16/8 h hell/dunkel Rhythmus kultiviert. Alle 14 Tage wurden sie in neue 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LS-Agar-Medium überführt. Die Betreuung dieser Kulturen, wie auch der Sprosskulturen (3.2), erfolgte durch Frau I. Rahaus.

3.4. Suspensionskultur von *H. perforatum* cv. Helos

Kulturen der Varietät Helos (**Abb. 9**) wurden von Dr. Franklin Gregory, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Portugal, in Suspension zur Verfügung gestellt. Als Medium diente ein modifiziertes MS-Medium, in dem die Zellen verschieden große Aggregate bildeten. In dem Medium waren 30 g/l Saccharose sowie 0,5 mg/l NAA enthalten. Die Kultivierung der Zellen fand bei einem 16/8 h Licht/Dunkelrhythmus bei 180 rpm statt. Zur Erhaltung und Vermehrung wurde ein Teil der Zellen alle 14 Tage in Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml frischem Medium gegeben.



Abb. 9: Suspensionskultur *H. perforatum* cv. Helos

3.5. Sterile *H. perforatum* Keimlinge

Samen aus 2001 von *H. perforatum* wurden zunächst 2 min mit 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Nach kurzem Trocknen auf Filterpapier wurden sie auf MS-Medium ausgestreut und zum Keimen im Dunkeln bei 24°C kultiviert.

4. Bakterienkulturen und Plasmide

4.1. *E. coli*-Stämme

Tab. 3: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Eigenschaften
DH5 α	<i>F'</i> ϕ 80 δ lacZ Δ M15 <i>end A1 rec A1 hsdR17(rk mk⁺) supE44 thi-1λ gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argFV169) deoR</i>
HB101	<i>SupE44 hsdS20 (rB-mB-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 mit pRK2013 kanR</i>

4.2. *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme zum Gentransfer

Tab. 4: Verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Stamm	Eigenschaften
C58C1/pMP90	Chromosomale Rifampizinresistenz und Gentamycinresistenz auf pMP90
AGL-1/UGAB7	Hypervirulenter Agrobakterienstamm mit Binärvektor UGAB7

4.3. Vektoren

Tab. 5: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung
pBIN19	10 kb großer Binärvektor mit Kanamycinresistenz als selektierbarem Marker in Bakterien und <i>nptII</i> zur Selektion transformierten Pflanzengewebes
pBSK:GFP-N/C-Fus	Fusionsvektoren mit GFP und einer Multicloning Site in C-bzw. N-Stellung zum GFP (Nowak <i>et al.</i> , 2004)
pRTL2:dsRed	Vektor, der nur für dsRed kodiert, als Transformationsmarker eingesetzt
pCK	pUC-basierter Vektor zur Klonierung, er enthält den CaVM 35S-Promoter
pFF:G/YFP:PTS1	Selektionsmarkergen <i>amp</i> , fluoreszierendes Protein mit Peroxisomenlokalisierungssignal
pGreen:GFP	3,2 kb großer Vektor zur Agrobakterien-vermittelter Transformation mit GFP und <i>nptI</i> zur Selektion

4.4. Anlegen einer Glycerolkultur

Um Bakterienzellen haltbar zu machen werden sie in Glycerol aufgenommen. Dazu versetzt man 800 µl Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerol und mischt kräftig, um sicherzugehen, dass das Glycerol gleichmäßig verteilt ist. Die Kultur wird nun in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann dann bei -80 °C gelagert werden. Aus dieser gefrorenen Dauerkultur können mit einem Zahnstocher jederzeit Zellen entnommen und in flüssigem Medium oder auf einer Agarplatte erneut vermehrt werden.

5. Klonierungstechniken

5.1. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

DNA-Fragmente wie PCR-Produkte oder ganze Gene können mit der T4-Ligase in linearisierte Vektoren kloniert werden. Voraussetzung ist die Kompatibilität der Enden des Vektors mit denen des Inserts. Beim T-Überhang-Vektor können mit der *Taq*-Polymerase amplifizierte Produkte auf Grund ihrer Adenosinreste direkt in den Vektor gebracht werden.

In anderen Fällen entstehen durch Restriktionsverdau klebrige oder glatte Enden am Insert, die dann im Falle der klebrigen Enden mit komplementären Basensequenzen im Vektor paaren.

In einen 10 µl Ligationsansatz wurden mindestens 150 ng Insert und 50 ng Vektor gegeben. Das molare Verhältnis kann 3:1 bis 10:1 betragen. T4-Ligase und Puffer wurden nach Angaben der jeweiligen Hersteller zugefügt. Die Ligation fand entweder in einer Stunde bei Raumtemperatur statt oder über Nacht bei 12 °C. Für spätere Verwendungen kann es notwendig sein, die Ligase bei 65 °C für 10 min zu denaturieren.

Beispiel eines Ligationsansatzes:

Vektor-DNA	50 ng
Insert	>150 ng
2×Puffer	5 µl
T4-Ligase (3U/µl)	0,3 µl
H ₂ O	x µl
Σ	10 µl

5.1.1. Klonierung mit dem pGEM[®]-T-Easy Vektor System (Promega, Heidelberg)

Der pGEM[®]-T-Easy Vektor ist ein high-copy Plasmid mit T7 und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren, die die Multicloning site mit einem lacZ flankieren. Positive Klone, die das

Insert aufgenommen haben, können auf Grund der lacZ-Kassette leicht durch Blau-/Weißselektion identifiziert werden.

Ein 3'terminales Thymidin an beiden Ende des offenen Vektors erhöht die Ligationseffizienz von PCR-Produkten, da diese nach der Amplifikation mit einer *Taq*-Polymerase einen Adeninüberhang besitzen.

Die Durchführung der Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

5.2. Transfer von Plasmiden in DH5 α

Um die Plasmide zu vermehren wurden sie in kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5 α transferiert. Diese wurden dann über Nacht angezogen und mit einer Minipräparation die Vektoren wieder daraus isoliert.

5.2.1. Transformation mittels Hitzeschock

Je 50 μ l kompetente *E. coli*-DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 μ l Plasmid versetzt. Der Ansatz inkubierte 20 min auf Eis, bevor er 45 sec lang auf 42 °C im Wasserbad erwärmt wurde (Hitzeschock). Anschließend wurde die Reaktion 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 900 μ l auf Raumtemperatur gebrachtem SOC-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler vermehrt. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min. Das Bakterienpellet wurde in ca. 200 μ l SOC-Medium aufgenommen und auf Selektivmedium ausgestrichen.

5.2.2. Transformation mittels Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l zu transformierender Plasmid-DNA versetzt. Nach einminütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette überführt und es erfolgte die Elektroporation bei 12,5 kV \times cm⁻¹ und mindestens 5 msec. Anschließend wurden sofort 960 μ l auf 42 °C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Zellen 45 min bei 37 °C auf dem Schüttler (225 rpm) inkubiert. 50 und 950 μ l des Ansatzes wurden auf Selektionsplatten ausplattiert.

Diese Arbeiten wurden im Institut für Pflanzenbiologie der TU-Braunschweig durchgeführt.

5.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Moleküle lassen sich durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach auftrennen. Anhand eines mitgeführten Größenstandards kann die Länge der aufgetrennten Fragmente bestimmt werden. Somit können Schnittstellen nachgewiesen oder bestimmte DNA-Fragmente identifiziert werden. Die Detektion der Nukleinsäuren im UV-Licht beruht auf der Zugabe des in die Doppelhelix interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (25 µg/ml).

Die Auftrennung erfolgte je nach erwarteter Größe der Fragmente in 0,7-2 % Agarose in 1xTAE bei einer Spannung von 5-10 Volt pro cm Gellänge. Vor dem Auftrag der Proben wurden sie mit jeweils 2 µl 6xLadepuffer versetzt, um sie zu beschweren und die Lauflänge abschätzen zu können.

5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur weiteren Verwendung der aufgetrennten Fragmente müssen diese aus der Gelmatrix eluiert werden.

Die entsprechende DNA-Bande wurde unter UV-Licht knapp aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe eines Extraktionskits vom Gel getrennt und aufgereinigt.

Dazu wurde zuerst das Volumen des ausgeschnittenen Agaroseblocks bestimmt (100 mg = 100 µl) und dieser in dreifachem Volumen Puffer bei 55-65°C geschmolzen. Anschließend wurde die DNA an Silicagel gebunden und mit Puffer oder Wasser nach der Reinigung von der Matrix wieder eluiert. Es wurden Kits von Quiagen, Gibco und MBI Fermentas jeweils nach den Angaben der Hersteller angewandt.

5.5. Plasmid-Isolierung aus Bakterienzellen

Die zur Vermehrung in *E. coli* transformierten Plasmide können mit verschiedenen Methoden aus der über Nacht-Kultur isoliert werden. Je nach der weiteren Verwendung und der benötigten Menge an Plasmid wurden die Protokolle angewendet.

5.5.1. Isolierungen mit Kits

Es wurden Kits verschiedener Hersteller nach ihren Angaben eingesetzt, wobei jeweils von 3 ml einer *E. coli*-über Nacht-Kultur ausgegangen wurde. Die DNA wurde zuletzt in 30-50 ml TE-Puffer oder Wasser aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Über die Säulen der Kits lässt sich besonders reine DNA gewinnen, jedoch ist die Konzentration der isolierten DNA im Vergleich mit anderen Methoden niedriger.

5.5.2. Minipräparation nach dem QUIAGEN Plasmid Purification Handbook (Puffer P1-3)

3 ml einer über Nacht-Kultur wurden 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 300 μl Puffer P1 mit 100 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA aufgenommen. Anschließend wurden 300 μl Puffer P2 dazugegeben und das Reaktionsgefäß 4-6 mal invertiert. Es folgte eine Inkubation von höchstens 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 300 μl eiskalter Puffer P3 zugegeben, der Ansatz wiederum durch Invertieren gemischt und für 15-20 min auf Eis inkubiert, um die genomische DNA, Proteine, Zellbruchstücke und SDS zu fällen. Nach einer Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit einem Volumen Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte mit 0,7 fachem Volumen Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15-30 min bei 13000 rpm. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

5.5.3. CTAB-Minipräparation (modifiziert nach Del Sal *et al.*, 1989)

1,5 ml einer 3 ml *E. coli*-über Nacht-Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und eine Minute mit 4000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgesaugt, das Pellet in 200 μl STET-Lysis-Puffer resuspendiert und mit 4 μl Lysozym (50 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde für zehn Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 45 Sekunden bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, RT) wurde das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Durch die Zugabe von 10 μl CTAB/NaCl (5 % / 2 M) bildete die DNA einen unlöslichen CTAB-DNA-Komplex, der nach fünf Minuten abzentrifugiert wurde (15000 rpm, 10 min, RT). Das DNA-Pellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in 300 μl 1,2 M NaCl durch

Vortexen vollständig gelöst. Nach Zugabe von 1 µl RNase (10 mg/ml) und Inkubation für fünf Minuten bei 37 °C erfolgte die Präzipitation der DNA mit 750 µl eiskaltem 96 %igen Ethanol für mindestens 20 Minuten bei –20 °C. Anschließend wurde die DNA pelletiert (15 min, 15000 rpm, 4 °C), der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (15000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Pellet nach gründlichem Entfernen des Ethanols kurz an der Luft getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 30 µl TE-Puffer oder Wasser gelöst. Die erwartete DNA-Menge liegt bei dieser Methode zwischen 2 und 10 µg.

5.6. Isolierung der Gesamt-DNA aus Agrobakterien

Von einer über Nacht-Kultur wurden 1,5 ml in einem Eppendorfgefäß bei 6500 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit je 500 µl Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und anschließend in 600 µl Agrobakterien-DNA-Expuffer resuspendiert. Der Suspension wurden 50 µl Proteinase K (5 mg/ml) zugefügt und intensiv geschüttelt, bevor nach Zugabe von 160 µl 10 % SDS das Gemisch geschwenkt und für 2 h bei 65 °C inkubiert wurde.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden dem Ansatz 500 µl zimmerwarmes Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm für 20 min erfolgte die Phasentrennung. Die Oberphase wurde abgenommen und mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt. In einer erneuten Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C, 20 min) wurde die DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Es enthielt die genomische DNA sowie auch das Ti-Plasmid und den Binärvektor, der wiederum in kompetente *E. coli* Zellen transformiert werden kann.

5.7. Photometrische Bestimmung der Plasmidkonzentration

Die Messung der DNA-Menge wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Dazu wurden je 10 µl der Plasmidpräparation in 490 µl H₂O gegeben und in einer Quarzküvette vermessen. Die erhaltene Absorption wird mit 2500 multipliziert und ergibt den Gehalt (µg) an Nukleinsäure pro ml Lösungsmittel.

5.8. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Bei einem Restriktionsverdau wird Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in definierte Abschnitte zerlegt. Anhand der Größe der entstandenen Fragmente kann z. B. kontrolliert werden, ob die vorhergehende Ligation erfolgreich verlief. Die DNA-Stücke können anschließend wieder in ein Plasmid eingefügt werden.

Es werden folgende Komponenten in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben:

Plasmid-DNA	1 µg
10×Reaktionspuffer (enzymspezifisch)	2 µl
Enzym	2 U
H ₂ O	x µl
Σ	20 µl

Der Ansatz wird für ein bis zwei Stunden bei 37°C (die Temperatur ist abhängig von dem eingesetzten Enzym) inkubiert.

5.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) dient der Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Die doppelsträngige DNA wird aufgeschmolzen und im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich die beiden Primer spezifisch an die Matrize an. Mit einer Polymerase wird ausgehend von den Primern der komplementäre Basenstrang synthetisiert. Das Aufschmelzen der DNA, Anlagern der Primer und die Elongation werden in mehreren Zyklen wiederholt, so dass das gewünschte DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt wird.

In dieser Arbeit kamen die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* und eine Polymerase mit Korrekturlese-Aktivität (Proofreading), die *Pwo*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* zum Einsatz.

Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt keine Endo- oder Exonukleaseaktivität und erzeugt bei der DNA-Synthese Adeninüberhänge an den 5'-Enden. Dadurch können diese Amplifikate ohne weitere Veränderungen in den pGEM[®]T-Easy Vektor ligiert werden.

Die *Pwo*-DNA-Polymerase ist durch ihre 3'→5'-Exonukleaseaktivität in der Lage, falsch eingebaute Basen zu korrigieren und somit die Fehlerrate zu verringern.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Buffer complete	2,5 µl
DMSO	1 µl
Primer reverse (10 µM)	2 µl
Primer forward (10 µM)	2 µl
dNTP-Mix (10mM)	2 µl
<i>Taq/Pwo</i> (2,5 U/µl)	0,5 µl
Template-DNA	20-500 ng
dH ₂ O	x µl
Σ	25µl

Der Programmablauf einer Standard-PCR:

Temperatur	Dauer	Zweck
94 °C	2 min	Initiale Denaturierung der Template-DNA
94 °C	1 min	30 Zyklen Denaturierung der doppelsträngigen DNA Primer-Annealing Elongation
55 °C	1 min	
72 °C	1,5 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
12 °C	∞	Stoppen der Reaktion

Zum Teil wurde eine Hot start-PCR durchgeführt, bei der die Zugabe der Polymerase erst nach der ersten Denaturierung in einem eingeschobenen 70 °C-Schritt erfolgt.

Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Basenzusammensetzung der Primer und wird in der Regel 5 °C niedriger als die errechnete Schmelztemperatur gewählt.

Annealing- wie auch Elongationszeit können variiert werden. Die Synthesezeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Abschnittes, wobei allgemein gilt, dass für den Einbau von 1000 Basenpaaren 1 min erforderlich ist.

Zur Kontrolle und weiteren Analyse wurde die PCR-Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und die Produkte wurden elektrophoretisch getrennt.

5.10. Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) mittels eines PerkinElmer ABI PRISM 377. Dabei werden fluoreszenzmarkierte DNA-Stücke mit Hilfe eines Lasers angeregt und während des Laufs im Polyacrylamidgel erfasst.

Die Markierung der DNA erfolgt am 3'-Ende durch den Einbau von Didesoxynukleotiden, die eine fluoreszierende Gruppe tragen und zum Abbruch der Polymerisation führen. Aus den verschieden langen ssDNA-Fragmenten lässt sich die Basensequenz bestimmen, da jede Terminatorbase einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff besitzt.

5.10.1. Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der DNA wurde eine PCR mit dem BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Da die verwendete DNA besonders rein sein sollte, wurden die Plasmide bevorzugt mit einer Säulenpräparation isoliert. 500-700 ng der isolierten Plasmid-DNA wurden mit den Bestandteilen des Kits wie folgt versetzt, wobei entweder gen- oder plasmidspezifische Primer verwendet wurden:

Sequenzierungsansatz:

BigDye-Lösung	2 µl
DNA-Matrize	500-700 ng
Primer (2 pmol/µl)	2 µl
H ₂ O	x µl
Σ	10 µl

Programmablauf der Sequenzier-PCR:

Temperatur	Dauer	Zweck	
94 °C	15 sec	30 Zyklen	Denaturierung der Template-DNA
48 °C	25 sec		Primer-Annealing
72 °C	1 min		Synthese
12 °C	∞		Stoppen der Reaktion

Anschließend wurde die DNA wie folgt gefällt:

Durch die Präzipitation der DNA mit Ethanol wurden überschüssige Primer und Nukleotide sowie der Puffer abgetrennt. Dazu wurde der Sequenzieransatz mit 90 µl Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 250 µl Ethanol versetzt und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde 2x mit je 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min bei 13000 rpm) und dann unter Vakuum in der Zentrifuge (Speed-Vac) oder bei 37 °C getrocknet.

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben in 2 µl Ladepuffer aufgenommen und bei 95 °C für 1,5 min denaturiert.

5.10.2. Sequenziergel

Zusammensetzung des Sequenziergels:

Harnstoff	9 g
10xTBE Puffer	3 ml
ddH ₂ O	11,5 ml
30 % Acrylamid	3,75 ml
TEMED	10 µl
10 % (w/v) APS	230 µl

9 g Harnstoff wurden in 30 % Acrylamidlösung, 10x TBE Puffer und HPLC-Wasser gelöst. Durch die Zugabe von 10 µl TEMED und 230 µl 10 % APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet und die Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Schichtdicke des Gels betrug 0,2 mm. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Apparatur eingespannt und mit je 1,5 µl der Sequenzierreaktionen beladen.

5.10.3. Auswertung der Sequenzierung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels des Softwareprogramms Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Zur Identifizierung der DNA-Abschnitte wurden die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg, Deutschland) herangezogen.

6. Transformationsmethoden

6.1. Indirekter Gentransfer mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation mit Agrobakterien stellt für viele dikotyle Pflanzen derzeit ein gut etabliertes System dar. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden besteht in dem zeitlich und materiell-technisch geringeren Aufwand und der relativ leichten Handhabung der Kulturen, da undifferenzierte Stadien (Kallusbildung) vermieden werden. Die zu übertragende Fremd-DNA ist durch die Border-Sequenzen auf dem Plasmid definiert.

6.1.1. Triple mating (Plasmidmobilisierung in *Agrobacterium*)

Mit Hilfe des triple mating wird ein in *E. coli* klonierter Binärvektor in einen *Agrobacterium*-Stamm transferiert. Diese Agrobakterien dienen dann als Genüberträger zur Transformation von pflanzlichem Gewebe. Neben dem *Agrobacterium*-Stamm und den *E. coli*-Bakterien mit dem Binärvektor benötigt man zusätzlich einen *E. coli*-Helferstamm.

Zunächst wurden die Agrobakterien in 3 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika 48 h bei 28 °C angezogen. Jeweils 3 ml LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin wurden mit den beiden *E. coli*-Stämmen inokuliert, wobei die Kultivierung hier über Nacht bei 37 °C stattfand.

Für das triple mating wurden in 3 ml YEB-Medium je 0,5 ml der *E. coli*-Kulturen mit 1 ml der *Agrobacterium*-Suspension gemischt und anschließend 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 0,5 ml YEB-Medium resuspendiert und in Tropfen auf eine YEB-Platte ohne Antibiotika gegeben. Es folgte eine Kultivierung für 48 h bei 28 °C.

Mit einer Impföse wurden von den Kulturen Zellen abgenommen und in 0,5 ml YEB-Medium suspendiert. Ausgehend von dieser Lösung wurden drei Verdünnungen von 10^{-4} bis 10^{-6} hergestellt, und davon je 100 μ l auf YEB-Medium mit drei Selektionsantibiotika ausgestrichen. Durch eine Inkubation für 48 h bei 28 °C wurden diejenigen Agrobakterien selektiert, die das entsprechende Plasmid aufgenommen hatten.

6.1.2. Infektion der Blätter und Regeneration von Sprossen

Die Agrobakterien wurden auf selektivem YEB-Medium ausgestrichen und für zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde anschließend für die Transformation in flüssigem YEB-Medium mit Antibiotika über Nacht bei 28 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 bei 660 nm kultiviert.

In Petrischalen mit je 20-25 ml Cokultivierungsmedium wurden verschiedene Mengen (400-3000 μ l) der Agrobakterien-Kultur gegeben.

Um Eintrittsstellen für die Bakterien zu erzeugen, wurden von den *H. perforatum*-Blättern die Ränder abgeschnitten, bevor die Infektion mit der Agrobakterien-Suspension erfolgte. Nach zwei Tagen Cokultivierung im Dunkeln wurden die Blätter dreimal mit flüssigem MS-Medium, Wasser oder Cefotaximlösung gewaschen und auf festes Regenerationsmedium mit 200 mg/l Cefotaxim übertragen (**Abb. 10**). Zwei Wochen später wurden die Explantate auf frisches Medium mit 200 mg/l Cefotaxim und 50 mg/l Kanamycin zur Selektion gesetzt, wobei in späteren Ansätzen auf Cefotaxim verzichtet wurde. Die nach zwei bis drei Wochen entstandenen Sprosse wurden zur Wurzelinduktion auf MS-Medium kultiviert und mit 50 mg/l Kanamycin selektiert.

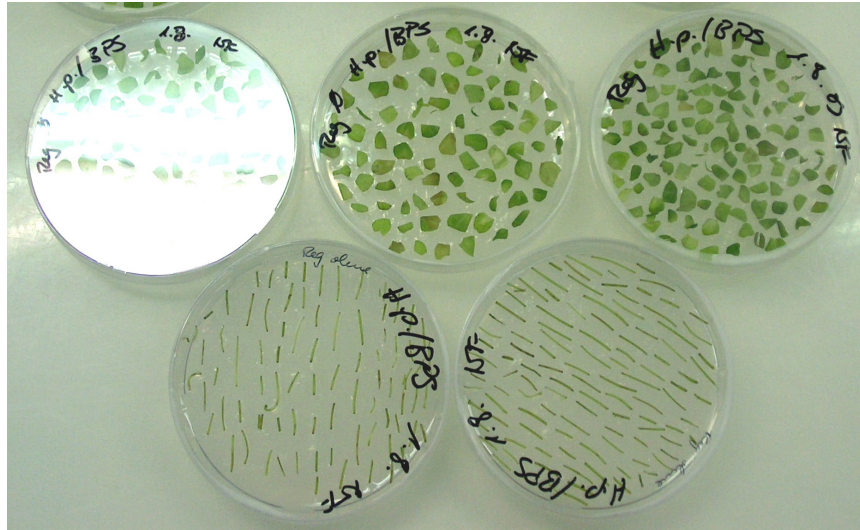


Abb. 10: Blattscheiben (oben) und Internodien (unten) von *H. perforatum* am ersten Tag der Regeneration

6.1.3. Internodien-Transformation:

Parallel zu den Blättern wurden die Internodien mit Agrobakterien infiziert. Dazu wurden diese Y-förmig eingeschnitten und ebenfalls in Cokultivierungsmedium mit Bakterien gegeben. Die Regeneration erfolgte in Analogie zu den Blattscheiben auf Hormonhaltigem Medium, ebenso wie die Selektion unter den gleichen Bedingungen stattfand.

6.1.4. Modifikationen der Transformation

Ausgehend von dem vorhergehend beschriebenen Protokoll wurden folgende Veränderungen vorgenommen, um eine Infektion von *H. perforatum* mit Agrobakterien zu erreichen:

A) Verlängerte Cokultivierung: Auf Grund der Ergebnisse des Endonukleasetests (8.2.) wurde bei der Regeneration teilweise kein Cefotaxim zugegeben. Dadurch verlängerte sich die Cokultivierung. Auch auf die Waschschrte nach der Agrobakterieninfektion wurde verzichtet. Dieses Vorgehen wurde in den nachstehend beschriebenen Modifikationen wiederholt.

B) Zusätze:

Zusatz von Mannit: Während der Blattscheibentransformation wurde dem Cokultivierungsmedium Mannit in den Konzentrationen 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M und 0,8 M zugegeben.

Acetosyringon: Vor Transformationsbeginn wurde die Agrobakterien-Kultur unter Zugabe von 100 μ M Acetosyringon eine bis mehrere Stunden geschüttelt. Die Infektion der Explantate erfolgte dann ebenfalls in Cokultivierungsmedium mit Acetosyringon (100 μ M).

C) Vorkultivierung:

In flüssigem Medium: Die Blätter und Internodien wurden 2-4 Tage in flüssigem MS- oder Cokultivierungsmedium, teilweise im Dunkeln, vorkultiviert und danach wie oben beschrieben mit den Agrobakterien infiziert.

Auf festem Medium: Neben der Vorkultivierung in flüssigem Medium wurden Internodien für zwei Tage auf festem MS-Medium kultiviert und anschließend in 25 ml Cokultivierungsmedium mit 10 ml Agrobakteriensuspension (OD_{660} 0,3) infiziert. In einer weiteren Variante erfolgte die Vorkultivierung sechs Tage unter Zugabe von 50-100 mg/l Kanamycin.

Temperaturbehandlungen: *In vitro*-Pflanzen wurden 14 und 24 h bei 4, 12, 24 und 37 °C kultiviert, bevor deren Blätter und Internodien mit Agrobakterien infiziert wurden (6.1.2. und 6.1.3.).

Mit zuvor präparierten Internodien erfolgte eine Vorkultur bei verschiedenen Temperaturen. Internodien wurden geschnitten und in mehreren Ansätzen über Nacht bei RT, 4°C, 15°C, 37°C und 42°C auf Regenerationsmedium vorkultiviert. Dabei waren einige der Internodien bereits Y-förmig eingeschnitten. Gleichzeitig wurden Agrobakteriensuspensionen auf Regenerationsmedium ausgestrichen und ebenfalls über Nacht angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden die Explantate auf die mit Agrobakterien bewachsenen Medien gelegt und 5 Tage cokultiviert. Danach erfolgte ein Waschschrift in flüssigem MS-Medium, nach dem wiederum einige Internodien eingeschnitten oder noch mal durchgeschnitten wurden. Zum Vergleich wurden Pappelinternodien parallel genauso behandelt.

Anaerobe Vorkultur: Eine ganze *in vitro*-Pflanze wurde drei bis sieben Tage im Anaerocult-Behälter (Anaerocult A, Merck, Darmstadt) einer CO₂-Atmosphäre ausgesetzt, bevor die Blätter und Internodien entweder erst 24 h auf MS-Medium mit 1 mg/BAP und 0,1 mg/l NAA gelegt oder gleich 24 h mit Agrobakterien kokultiviert wurden.

D) Verschiedene Pflanzenmaterialien:

Keimlinge und Sprosse: Als Ausgangsmaterial für die Transformation wurden auch junge Keimlinge sowie Triebe aus der Sprosskultur eingesetzt. Ein Teil dieses Pflanzenmaterials wurde vor der Infektion mit den Bakterien 10 sec im Ultraschallbad behandelt, um die Zellwände etwas zu schädigen. Die Infektion erfolgte dann wie für die Blattscheiben beschrieben. Zur Regeneration wurden die ganzen Pflanzen auf Agarplatten übertragen, wobei versucht wurde, die Wurzeln in das Medium hineinzustecken. Auf Grund der geringen Größe und Instabilität der Sprosse war dies allerdings nicht immer möglich.

Kallus: Kalli von *H. perforatum* wurden in Kokultivierungsmedium 6 sec mit Ultraschall behandelt und nach Zugabe einer Agrobakteriensuspension 10 min einem Vakuum ausgesetzt. Die Hälfte der so behandelten Zellen wurde sofort auf Regenerationsmedium gesetzt, der andere Teil schüttelte zuvor weitere zwei Tage in dem Kokultivierungsmedium bei 25 °C und 180 rpm.

E) Verwendung eines hypervirulenten Agrobakterien-Stamms:

Infektion mit AGL1: Acht Stunden vor der Infektion mit den hypervirulenten Agrobakterien wurden die Blätter und Internodien auf Regenerationsmedium gelegt. Eine über Nacht-Kultur von AGL1 wurde mit 100 µM Acetosyringon eine Stunde lang inkubiert. Anschließend erfolgte die Kokultivierung der Pflanzenteile mit den Bakterien für zwei Tage. Danach wurden die Explantate mit MS-Medium gewaschen und 14 Tage auf Regenerationsmedium ohne Antibiotika ausgelegt.

6.2. Infiltration mit Agrobakterien

Die Infiltration von Blättern mit einer Agrobakterien-Suspension kann mit Hilfe einer stumpfen Spritze oder über Vakuum geschehen. Dabei werden die Agrobakterien in die Interzellularen gebracht und gelangen von dort in die Zellen. Nach einigen Stunden oder Tagen lässt sich das Genprodukt nachweisen.

Für diese Arbeit wurden *Hypericum*-Pflanzen aus dem Freiland ins Gewächshaus überführt. Die Blätter an diesen Pflanzen wurden dann mit einer stumpfen Spritze mit Agrobakterien infiltriert.

6.3. Protoplastentechnik

Von pflanzlichen Zellen können mittels enzymatischem Verdau die Zellwände entfernt werden, so dass „nackte“ Zellen entstehen, die nur noch vom Plasmalemma umgeben sind. Solche Protoplasten sind Ansatzpunkt vieler Transformationen und der somatischen Hybridisierung.

6.3.1. Isolierung von Protoplasten aus *H. perforatum*

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Protoplasten wurden Sprosse der *H. perforatum* Sprosskulturen verwendet. Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

In eine Petrischale mit 5 ml PBSOs wurden 10-20 Spross-Cluster überführt. Aus diesen wurden dann mit dem Skalpell vorsichtig einzelne Sprosse abgetrennt und in 20 ml PBOsE gegeben. In der mit Parafilm verschlossenen Petrischale erfolgte die Inkubation über Nacht bei 25°C in Dunkelheit. Unter dem Mikroskop wurde am nächsten Tag die Freisetzung der Protoplasten überprüft. Danach wurden die übrigen Sprosse entfernt und das Medium mit den Protoplasten durch ein steriles 80 µm-Nylonsieb gegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (200 rpm, 10 min) und in MSM aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und die Protoplasten in 1 ml MSM aufgenommen. Die Ausbeute wurde erneut unter dem Mikroskop bestimmt.

6.3.2. Transformation von Protoplasten mit PEG

Die Protoplasten aus einem Milliliter wurden abzentrifugiert und vorsichtig mit 10 µg DNA (GFP) in 1 ml MSM mit 20 % PEG versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation in Dunkelheit wurde der Ansatz schrittweise 5 mal mit MSM verdünnt. Dann wurden die Protoplasten bei 500 rpm 10 min pelettiert und inkubierten anschließend 30 min in 1 ml MSM mit 10 µl DNase. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in einem ml MSM aufgenommen.

Mindestens 20 h später konnte im LSM (7.2.) auf Expression des GFP untersucht werden.

6.4. Transformation mittels Partikelkanone

Mit der von J. Stanford entwickelten Heliumkanone werden mit DNA beladene Goldkügelchen (Chempur, Karlsruhe, Deutschland) in das zu transformierende Gewebe geschossen. Der Makrocarrier (flying disc) mit den Goldpartikeln wird in das Acceleration Tube eingesetzt. Darunter befindet sich ein Netz, die Stop-Platte, und weiter unten wird auf einer Petrischale das zu beschießende Material eingesetzt (**Abb. 11**). Nach Anlegen eines Vakuums wird solange Helium eingeleitet, bis die Berstscheiben platzen und einen konstanten Druck auf die flying disc freigeben. Diese wird von der Stopplatte zurückgehalten, die beladenen Partikel werden beschleunigt und treffen auf die Petrischale mit dem Pflanzenmaterial. Die Kraft, mit der die Partikel auftreffen, kann zum einen über den Druck mit der Anzahl der Berstscheiben verändert werden – jede Berstscheibe hält ca. 350 psi - oder durch Änderung der Entfernung der Petrischale zur Stop-Platte.

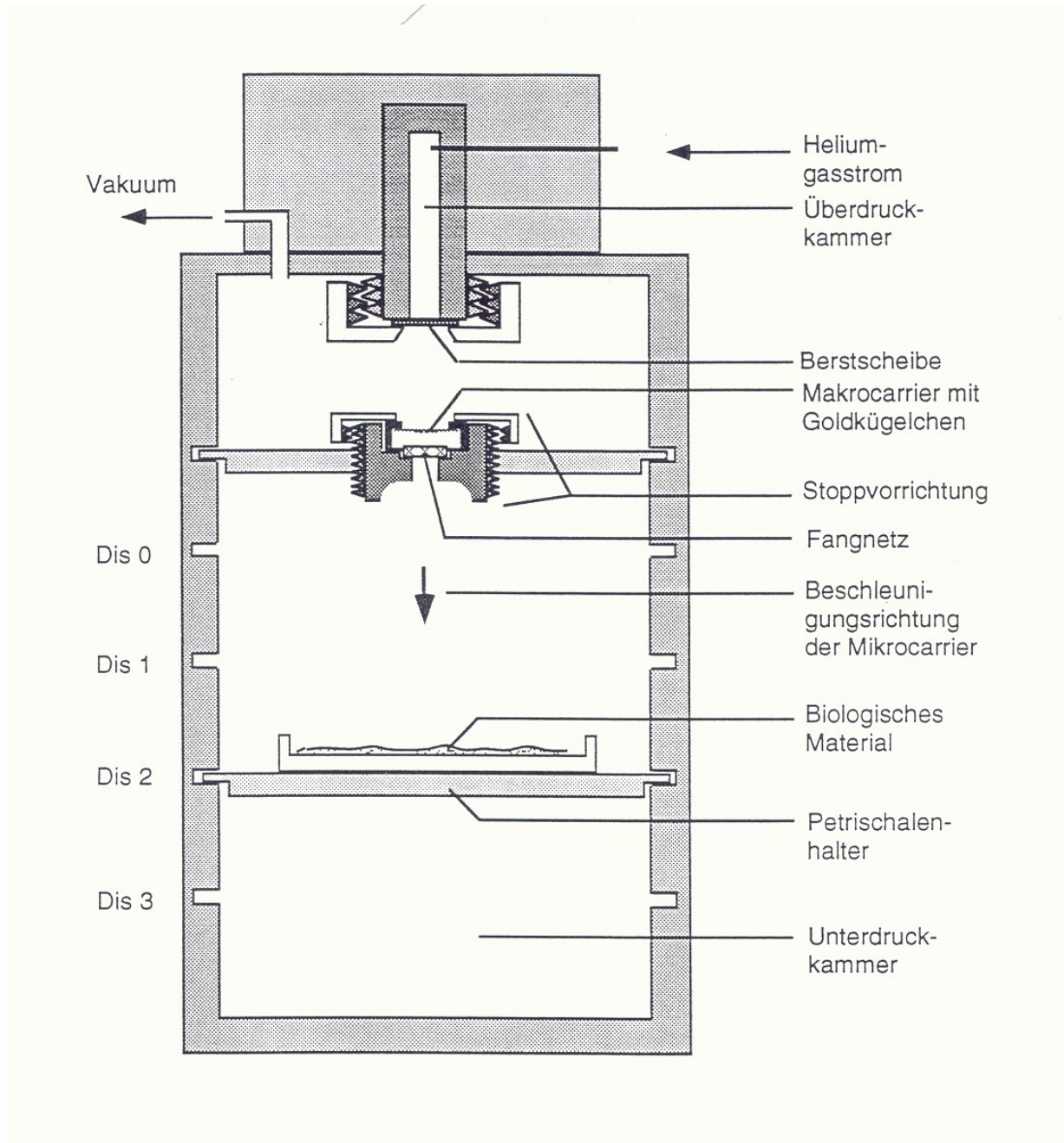


Abb. 11: Schema der Partikelkanone nach Sanford

6.4.1. Beladen der Goldpartikel (Coating)

Das Gold wird in einem Ansatz für sechs Schuss vorbereitet. Dazu wurden 3 mg Gold in 100 µl 70 % Ethanol aufgenommen und 20 sec gevortext. Das Gold soll danach fein verteilt sein. Die Suspension wurde für 1 min auf Eis stehen gelassen und danach 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 50 µl H₂O

aufgenommen und solange gevortext, bis das Gold resuspendiert ist. Dann wurde der Ansatz 1 min auf Eis ruhen gelassen.

Danach wurde 15 sec bei 500 rpm ohne Bremse zentrifugiert, das Pellet in 50 µl 50 % Glycerin durch Vortexen aufgenommen und anschließend 10 sec im Ultraschallbad behandelt.

Die Suspension wurde auf Eis gestellt und die DNA (ca. 4 µg in 7 µl) hinzugefügt. Mit der Pipettenspitze wurde der Ansatz gemischt, leicht fingergevortext und für 5 min auf Eis stehen gelassen.

Nach Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂ wurde erneut fingergevortext und nach ungefähr 1 min erfolgte die Zugabe von 20 µl kaltem Spermidin. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gestellt, bis die DNA-Front etwas abgesackt war.

Anschließend wurde 15 sec mit 500 rpm ohne Bremse zentrifugiert und das Pellet in 100 µl 70 % Ethanol durch starkes Fingervortexen aufgenommen. Diese Suspension wurde erneut 15 sec bei 500 rpm zentrifugiert und das Gold in 50 µl wasserfreiem Ethanol durch Fingervortexen aufgenommen.

Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet in 35 µl wasserfreiem Ethanol resuspendiert und zuletzt 2 bis 3 sec im Wasserbad ultrabeschallt. Mit je 5 µl dieser Suspension wurden die flying discs (Microcarrier) beladen und 5 min unter der Sterilwerkbank getrocknet.

6.4.2. Vorbereitung der Blätter und Internodien

Mehrere ganze Blätter der *in vitro*-Kulturen von *H. perforatum* wurden mit der Unterseite nach oben in Petrischalen ausgelegt. Dabei wurden die Blätter so verteilt, dass die Mitte der Schale dicht bedeckt war. Als Untergrund diente mit sterilem Leitungswasser befeuchtetes Filterpapier. Am darauffolgenden Tag wurden die Explantate beschossen.

In ebensolcher Weise wurden auch Internodien in der Mitte einer Petrischale dicht aneinander gelegt, um sie zu transformieren.

Alle Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

6.4.3. Vorbereitung der Helos-Suspensionskultur

Für die Transformation mittels Partikelkanone wurden zunächst die feineren Kalli der *H. perforatum*-Suspension mit einem Sieb von den größeren Zellaggregaten getrennt und 5-7 Tage in frischem Medium kultiviert. Zur Vorbereitung auf das Partikelbombardement wurden die Zellen dünn auf Filterpapier aufgetragen und dieses dann in Petrischalen auf festes MS-Medium gelegt. So wurden die Kulturen über Nacht im Kulturraum verwahrt und am nächsten Tag für die Transformation eingesetzt.

6.4.4. Kanonenbedienung

Vor den Arbeiten muss die Kanone mit Ethanol ausgesprüht werden, um eine möglichst sterile Umgebung zu schaffen.

Die Berstscheiben werden eingesetzt und in der vorgesehenen Halterung festgeschraubt. Das ausgeglühte Stopnetz wird eingelegt und der beladene Microcarrier in das Acceleration-Tube eingefügt. Die Halterung wird festgeschraubt und in der Kanone in die dafür vorgesehene Schiene eingeschoben.

Eine Petrischale mit zu beschießendem Material wird ohne Deckel an gewünschter Position in das Gerät eingesetzt.

Nachdem die Tür verschlossen wurde, wird ein Vakuum angelegt. Dann wird durch Einleiten von Helium Druck auf die Berstscheiben gegeben, bis diese zerplatzen. Dadurch wird der Druck schlagartig auf die flying disc freigegeben und der Microcarrier prallt gegen die Stop-Platte. Die Goldpartikel werden beschleunigt und treffen auf das Pflanzenmaterial auf, wo sie die Zellwand durchdringen und so die DNA ins Innere der Zelle bringen. Anschließend wird die Kammer der Kanone sofort belüftet, um die Zellen nicht weiter zu belasten. Die Petrischale wird entfernt und mit Parafilm verschlossen.

6.4.5. Selektion putativ transformierter Zellen

Nach drei bis fünf Tagen konnte im cLSM auf transiente Genexpression untersucht werden (7). Zur Selektion wurden die Filterpapiere mit den Zellen darauf eine Woche nach dem Beschuss auf MS-Medium mit Selektionsantibiotika gelegt. Dieses Medium wurde alle zwei Wochen gegen frisches ausgetauscht.

6.4.6. Regeneration von Sprossen aus Suspensionskultur

Die Zellen wurden auf Filterpapier aufgetragen und auf MS-Medium mit 1.0 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA gelegt. Für die ersten 14 Tage wurden sie im Dunkeln bei 25 °C angezogen. Nachdem die Zellen begonnen haben, sich in dieser ersten Kulturphase zu vermehren, erfolgte der Transfer der Filterpapiere auf frisches Medium und die weitere Kultur in einem 16/8 h hell/dunkel-Rhythmus, mit 14 tägiger Subkultur. Wenn sich die ersten Sprosse entwickelten, wurde das Medium gegen MS-Medium ohne Wachstumsregulatoren ausgetauscht.

7. Detektion transformierter Zellen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop

7.1. Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) stammt aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* und wurde erstmals von Shimomura *et al.* (1962) beschrieben. Mit Hilfe von Aequorin, welches durch eine chemische Reaktion Licht erzeugt, wird das GFP zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Dadurch erhält die Qualle die Fähigkeit zur Biolumineszenz.

1992 wurde das Gen für GFP von Prasher *et al.* (1992) kloniert und charakterisiert. Vier Jahre später lösten Ormö *et al.* und Yang *et al.* (1996) die Proteinstruktur. GFP besitzt 11 β -Faltblätter, welche eine Hohlzylinderstruktur bilden. Diese wird zentral von einer α -Helix durchzogen, in der sich die fluorophore Gruppe aus drei Aminosäuren befindet. Das gesamte Protein besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Größe von 27 kDa. Das Anregungsspektrum des GFP besitzt ein Maximum bei 489 nm (blau) und das Emissionsspektrum zeigt ein Maximum von 508 nm (grün).

Die für GFP codierende DNA kann am 3'- oder 5'-Ende mit der DNA des zu untersuchenden Proteins fusioniert und im heterologen System expremiert werden. Für die Expression in Pilzen, Pflanzen, Bakterien, Insekten und Nematoden ist weder die Zugabe von Substraten noch Cofaktoren erforderlich (Chalfi *et al.*, 1994).

GFP wird als biologische Sonde, z.B. in der Promotoranalyse, zur Proteinlokalisierung oder in Proteindynamikstudien an lebenden Zellen eingesetzt, wobei die Fusionsproteine transient oder stabil im Zielorganismus heterolog expremiert werden können.

Durch Mutagenese der zentralen chromophoren Gruppe konnten verschiedene Fluoreszenzproteine erstellt werden (Heim *et al.*, 1994, Cormack *et al.*, 1996; Reichel *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich in ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum, so dass Zellen mit unterschiedlichen Fluorophoren mehrfach transformiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit dient das grün fluoreszierende Protein als schneller und zuverlässiger Marker zum Nachweis erfolgreicher Transformation.

7.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM 510 META)

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie wird das Licht aus einer einzigen Ebene des Objekts erfasst.

Mit monochromatischem, stark gebündeltem Licht wird über ein Objektiv die Fluoreszenz der Probe angeregt. Durch zeilenweises Abrastern des Objekts mit dem Laser entsteht ein hochaufgelöstes digitales Bild der Probe. Das emittierte Licht wird durch das Objektiv gesammelt und passiert Farbteiler und Emissionsfilter, bevor es zum Detektor (Photomultiplier, PMT) gelangt. Durch die konfokale Lochblende (Pinhole) vor dem Detektor wird verhindert, dass Licht, welches nicht aus der gewünschten Ebene stammt, vom Photomultiplier detektiert wird. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, einen optischen Schnitt eines biologischen Präparates aufzunehmen, ohne dieses mechanisch zu zerstören. Verschiebt man die Fokusebene (Z-Ebene) schrittweise, erhält man mehrere optische Schnitte, die mit Hilfe eines Computerprogramms zu einem dreidimensionalen Abbild zusammengesetzt werden können.

Mit dem META-Detektor der Firma Zeiss können mit Emissions Fingerprint auch stark überlagernde Emissionsspektren voneinander getrennt und unterschieden werden. Im Vergleich mit Referenzspektren können einzelne Fluorophore identifiziert werden, so dass der Einsatz mehrerer fluoreszierender Proteine in einem Präparat möglich ist.

8. Sonstige Techniken

8.1. Test auf bakteriostatische Wirkung

Mit einem einfachen Test kann eine erste Aussage über die antibiotische Wirkung einer Pflanze gemacht werden. Aus *Hypericum perforatum* wurde ein methanolischer Extrakt hergestellt, indem das Pflanzenmaterial im Mixer zerkleinert und anschließend einen Tag in Methanol geschüttelt wurde. Die Suspension wurde abgefiltert und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer verdampft. Mit 50 µl dieses dickflüssigen Extrakts wurden Zellstoffplättchen getränkt und auf LB-Medium aufgelegt. Anschließend wurden die LB-Agar-Platten mit einer Agrobakteriensuspension besprüht und einen Tag bei 37°C inkubiert.

8.2. Untersuchung auf Endonukleaseaktivität

Durch Endonukleasen werden Nukleinsäuren intern geschnitten. Dabei gibt es spezifische und unspezifische Endonukleasen und welche, die bevorzugt doppelsträngige oder einzelsträngige DNA schneiden.

8.2.1. Herstellung der Probelösung

100 mg Blatt- bzw. Pflanzenmaterial wurden in 150 µl KPi-Puffer mit etwas Seesand in einem Eppendorfgefäß zerquetscht und anschließend 2 mal 10 sec mit Ultraschall behandelt. Das Pflanzenmaterial wurde bei 4 °C mit 10000 rpm pelletiert und der Überstand (Rohextrakt) zur Proteinmessung nach Bradford eingesetzt.

Für diese Untersuchung wurden Blätter von *H. perforatum*-Pflanzen aus dem Freiland sowie Blätter und Internodien von *in vitro*-Kulturen verwendet. Als Vergleichslösung diente der Rohextrakt aus Blättern von *Nicotiana tabacum*-Erdkultur.

8.2.2. Endonukleasetest

In einem Endvolumen von 20 µl wurden 5 µg Vektor pBSK/GFP-BPS mit 25 µg Rohprotein in KPi-Puffer versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für drei Stunden.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

8.3. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Zur Messung des Proteingehaltes wurde eine Lösung von Coomassie-Brilliantblau G250 verwendet. Ihr Absorptionsmaximum verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen von 465 nm auf 595 nm.

2 µl der zu untersuchenden Lösung wurden mit 98 µl H₂O und 900 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer mit BSA angefertigten Kalibriergeraden bestimmt werden.

III. Ergebnisse

1. Transformation von *H. perforatum* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

In der vorliegenden Arbeit sollte ein System zur Transformation von *H. perforatum* gefunden werden. Dazu wurde zunächst der indirekte Gentransfer durch Agrobakterien gewählt. Nach der Erstellung des Binärvektors und der Infektion des Pflanzengewebes erfolgte die Regeneration und Selektion neuer Sprosse aus putativ transformierten Zellen.

1.1. Erstellung des Binärvektors pBIN19 mit dem Benzophenon-Synthase-Gen

Zu Beginn der Arbeit stand das Gen für die Benzophenon-Synthase (BPS) unter Kontrolle des zweifachen 35S-Promotors im pCK-Vektor zur Verfügung (**Abb. 12**). Mit dem Restriktionsenzym *Hind*III wurde das 2,3 kb große Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde die Genkassette unter Verwendung der T4-Ligase in pBIN19 kloniert (**Abb. 13**). Dieser Vektor ermöglicht durch das lacZ-Gen ein blau/weiß-Screening auf Klone, die das Insert enthalten. Mittels Hitzeschock wurde das Plasmid in den *E. coli*-Stamm DH5 α transferiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte in einer PCR mit genspezifischen Primern der Nachweis des Inserts in weißen Klonen. Die hierbei benutzten Primer 3h2 und 5h2-1 umfassen den 1200 bp großen ORF.

Mit einem positiven *E. coli*-Klon, dem Agrobakterien-Stamm C58C1/pMP90 und dem *E. coli*-Helferstamm HB1.1 wurde das triple mating durchgeführt. Ein anschließender Insert-Nachweis, wiederum mit dem Primerpaar 3h2/5h2-1, bestätigte den erfolgreichen Transfer des Vektors in *A. tumefaciens*.

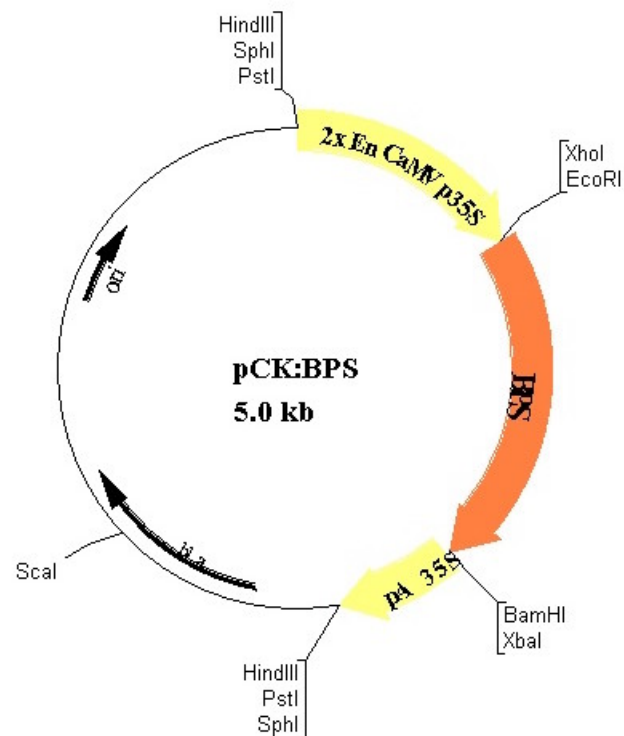


Abb. 12: Karte des pUC-basierten Vektors pCK:BPS mit dem doppelten 35S-Promotor

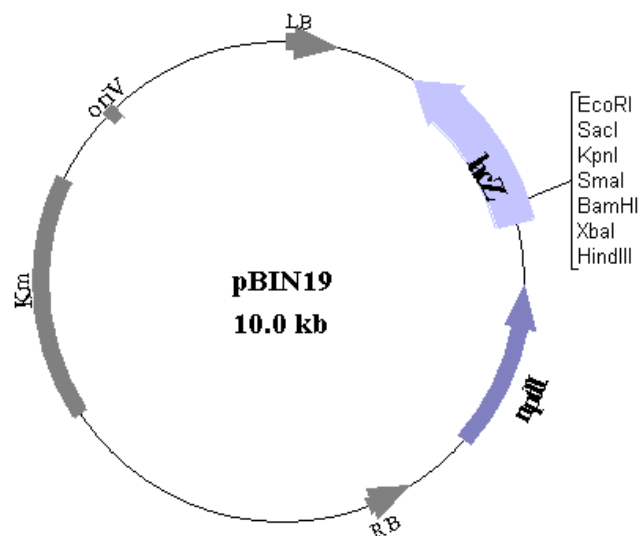


Abb. 13: Binärvektor pBIN19 mit rechter und linker Grenze (LB und RB) sowie lacZ-Gen mit multipler Klonierungsstelle

1.2. Regeneration von Sprossen und Selektion

Die mit Agrobakterien infizierten Pflanzenteile wurden auf Regenerationsmedium zum Ausbilden neuer Sprosse angeregt. Nach 10-14 Tagen zeigten sich an den Schnittstellen der Blatt-Explantate erste Sprosse. An den Internodien verfärbten sich die Enden während der Kultur dunkelbraun, was jedoch die Regeneration nicht zu beeinträchtigen schien. Auch hier wuchsen neue Sprosse innerhalb von 14 Tagen aus der gesamten Oberfläche der Stängelstücke heraus. Die Geschwindigkeit, mit der sich die jungen Sprosse aus den Explantaten entwickelten, variierte zunächst in Abhängigkeit von der vorhergehenden Behandlung. Nach einigen Wochen aber hatten alle Sprosse die selbe Größe erreicht. Ohne Selektion wuchsen die regenerierten Pflanzen auf dem hormonhaltigen Medium innerhalb von 3 Wochen zu einem etwa einen Zentimeter großen grünen Spross heran (**Abb. 14**). Unter anschließender Selektion mit 50 mg/l Kanamycin entfärbte sich ein Großteil der neu gebildeten Blätter und wurde blassgrün bis farblos. Ca. 5 % der ursprünglich regenerierten Sprosse blieben auch nach weiteren 6 Wochen auf Selektionsmedium grün. Diese Pflanzen wurden auf MS-Medium ohne Wachstumsregulatoren übertragen, um die Wurzelbildung zu induzieren. In der folgenden Kultur stellten die verbliebenen Sprosse aber nach 1-2 Monaten unter Selektionsdruck ihr Wachstum ein und entwickelten in dieser Zeit auch keine Wurzeln. Nach und nach entfärbten sich die Sprosse und starben letztendlich ab.

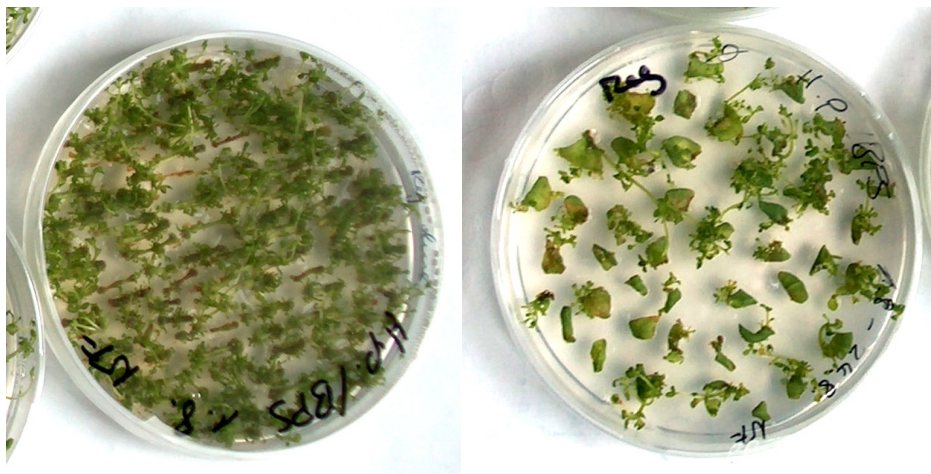


Abb. 14: Regeneration von Sprossen aus Internodien (links) und Blattscheiben (rechts) drei Wochen nach der Transformation mittels *A. tumefaciens* auf Regenerationsmedium ohne Selektion.

Die Ergebnisse der verschiedenen Modifikationen des Standardprotokolls zur Agrobakterien-vermittelten Transformation sind im nachfolgenden einzeln beschrieben.

1.2.1. Variationen der Cokultivierung und Regeneration

Unabhängig von den unten beschriebenen Variationen wurden die Explantate nach jeweils ein bis drei Tagen Cokultivierung in flüssigem Medium zur Regeneration auf festen Nährboden gegeben. Im Verlauf der meisten Transformationen wurden die Blattscheiben und Internodien nicht direkt nach der Infektion (Cokultivierung) gewaschen, so dass die Agrobakterien mit auf das Regenerationsmedium übertragen wurden. Dennoch konnte nur in wenigen Fällen nach einigen Tagen ein Überwachsen der Explantate mit Agrobakterien beobachtet werden. Zum Vergleich wurden Blätter von *N. plumbaginifolia* bei einigen Transformationen mit derselben Agrobakteriensuspension infiziert. Aus diesen Explantaten wuchs nach zwei Tagen der Agrobakterienrasen heraus und breitete sich auf der gesamten Blattoberfläche und um die Blätter herum massiv aus.

A) **Zusatz verschiedener Komponenten:**

Zusatz von Acetosyringon: Die erste Veränderung am Protokoll war die Zugabe von 100 µM Acetosyringon zum Cokultivierungsmedium. Im Vergleich zu Transformationsansätzen ohne weitere Zusätze ließen sich keine Unterschiede an den Explantaten oder dem Medium erkennen. Die Gewebestücke entwickelten innerhalb von 2 Wochen, wie oben beschrieben, die ersten grünen Sprosse an den Schnittstellen. Unter anschließender Selektion überlebten keine resistenten Pflanzen. Dennoch wurde den folgenden Transformationen Acetosyringon zugesetzt, da es allgemein die Aktivität der Agrobakterien stimuliert. Bei einigen Ansätzen erfolgte vor der Infektion der Explantate eine Inkubation der Bakterien mit 100 µM Acetosyringon, was die Transformation jedoch ebenfalls nicht positiv beeinflusste.

Zusatz von Mannit: Dem Cokultivierungsmedium wurden verschiedene Mannitkonzentrationen zwischen 0,2 und 0,8 M zugefügt. Nach zwei Tagen Cokultivierung unter Zugabe von mehr als 0,4 M Mannit waren die Blattscheiben schlapp und welk. Sie wurden auf Regenerationsmedium übertragen und zeigten nach einer Woche nekrotische braune Stellen. Aus diesen Blattscheiben regenerierten keine Sprosse. Die Triebe der Blätter, die mit geringeren Konzentrationen Mannit behandelt wurden,

entwickelten sich zunächst wie diejenigen ohne Zusätze, überstanden aber die anschließende Selektion nicht.

B) Vorkultivierung der Explantate und *in vitro*-Pflanzen:

Vorkultivierung auf Kanamycin: Präparierte Internodien wurden vor der Infektion sechs Tage auf Regenerationsmedium mit 50 und 100 mg/l Kanamycin kultiviert. Nach der Behandlung mit den Agrobakterien erfolgte zunächst die Regeneration auf Medium ohne Antibiotika, wobei die Bakterien innerhalb von zehn Tagen die Stängelstücke überwuchsen. Daraufhin wurden die Internodien dreimal mit sterilem Wasser, dann einmal mit einer Lösung aus 500 mg/l Cefotaxim und anschließend erneut mit Wasser gewaschen, bevor sie auf Cefotaxim-haltiges Medium überführt wurden. In der folgenden Kultur wuchsen die Agrobakterien nicht noch einmal aus den Explantaten heraus. An den zuvor überwachsenen Internodien regenerierten nicht so viele Sprosse wie in anderen Transformationsansätzen zu beobachten waren, doch auch hier stellte sich keiner dieser Triebe unter Selektion als erfolgreich transformiert heraus.

Vorkultur bei verschiedenen Temperaturen: Zunächst wurden ganze Pflanzen für 14 und 24 h bei Temperaturen zwischen 4 und 37 °C kultiviert. Diese Behandlung ließ keine äußerlichen Veränderungen an den Pflanzen erkennen, deren Blätter und Internodien anschließend zur Transformation eingesetzt wurden. Neben ganzen Pflanzen wurden auch zugeschnittene Internodien von nicht vorbehandelten Pflanzen über Nacht bei verschiedenen Temperaturen von 15-42 °C auf Agarplatten inkubiert und am nächsten Tag mit Agrobakterien infiziert. Mit keiner dieser Vorkulturen konnten stabil transformierte Pflanzen erzeugt werden.

Anaerobe Vorkultur: *In vitro*-Pflanzen von *H. perforatum* wurden für eine Woche unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Blätter sowie Internodien wurden anschließend mit Agrobakterien infiziert. Ein Teil der Internodien wurde vor der Transformation für weitere 24 h auf MS-Medium mit 1 mg/l 2,4-D und 0,1 mg/l NAA vorkultiviert und für einen Tag mit den Bakterien (3 ml/20 ml Medium) versetzt. Bei diesen Explantaten wuchsen nach 2-3 Tagen auf festem Medium (Regenerationsmedium) die Agrobakterien heraus. Nach den Waschschritten mit H₂O und 500 mg/l Cefotaxim wurden die Stängelstücke auf frisches Regenerationsmedium zum weiteren Wachstum und zur anschließenden Selektion

übertragen. Die regenerierten Sprosse erwiesen sich nicht als Kanamycin-resistent und starben im Verlauf der Kultivierung ab.

C) Infektion verschiedener Ausgangsgewebe:

Kallus: Nach der Infektion des *H. perforatum*-Kallus wuchsen die Bakterien auf den Agarplatten um das Pflanzengewebe herum. Dieses wurde daraufhin auf Regenerationsmedium mit 500 mg/l Cefotaxim übertragen. Aus den undifferenzierten Zellen entwickelten sich keine neuen Sprosse. Sie verfärbten sich dunkelbraun und zeigten schleimige Konsistenz.

Sprosskulturen: Die kleinen Triebe der Spross-Kultur wurden voneinander getrennt und zunächst 10 sec mit Ultraschall behandelt. Nach der Cokultivierung in einer Agrobakterien-Lösung wurden sie auf festes Nährmedium ohne antibiotische Zusätze übertragen. Von der zweiten Woche an wurde dem Medium Kanamycin zugesetzt. Die Selektion überlebten die Sprosse nicht, so dass keine transgenen Johanniskraut-Pflanzen erhalten werden konnten.

Keimlinge: Zur Transformation wurden 14 Tage alte Keimlinge eingesetzt. Die Keimlinge wurden zerschnitten und mit Agrobakterien infiziert. Zur Regeneration wurden sie auf Hormon-haltigem Medium ausgelegt. Unter Selektionsdruck regenerierten jedoch keine neuen Sprosse.

D) Hypervirulenter *A. tumefaciens*-Stamm:

Transformation mit AGL1: Nach der Cokultivierung der Blattscheiben und Stängelstücke mit dem hypervirulenten Agrobakterien-Stamm AGL1 befanden sich im Medium schleimig-fädrige Strukturen, die teilweise dem Pflanzenmaterial anhafteten. Sechs Tage später, auf festem Medium ohne Antibiotikum, waren jedoch keine Bakterien um die Explantate herum zu beobachten. Im Verlauf der Regeneration und Selektion mit Bialaphos (5mg/l) wuchsen keine resistenten Sprosse.

2. Isolierung und Transformation von Protoplasten

Als weitere Transformationsmethode wurde ein Gentransfer in Protoplasten angestrebt. Die Isolierung der „nackten“ Zellen sowie die Kontrolle auf Transformation mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops sind im folgenden beschrieben.

2.1. Protoplastenisolation aus *H. perforatum*-Blättern

Die Präparation erfolgte nach Absatz 6.2.1. in Material und Methoden. Bei der ersten mikroskopischen Kontrolle der Protoplastenfreisetzung wurden die Zellen zwar nicht gezählt, es zeigte sich aber, dass Protoplasten aus den Trieben mit Hilfe der Enzyme freigesetzt werden konnten. In der zweiten optischen Untersuchung, nach der Filtration, befanden sich in 1 ml MSM Medium 4500 Zellen. Nach der Zugabe von 0,6 µl GFP-DNA (10 µg) und MSM mit PEG konnten nur noch sehr wenige Protoplasten unter dem Mikroskop festgestellt werden. Auch das Pellet nach der folgenden Zentrifugation war makroskopisch kaum sichtbar.

2.2. Detektion transformierter Protoplasten

Nach über 20 Stunden wurden die Protoplasten im Institut für Pflanzenbiologie am cLSM untersucht. Die wenigen Zellen wurden mit 488 nm angeregt und unter dem Mikroskop durchgemustert. Es konnte Chlorophyllautofluoreszenz beobachtet werden, aber kein Protoplast zeigte die GFP-typische grüne Fluoreszenz. Aus diesem Grund wurden die Protoplasten nicht zur Regeneration weiter kultiviert.

3. Biolistische Transformation

Für die Transformation mittels Partikelkanone wurden fluoreszierende Proteine eingesetzt. Somit konnte die transiente Expression der Fremdgene mit dem Laser Scanning Mikroskop untersucht werden. Zudem wurde ein Fusionsprotein aus GFP und BPS erstellt und in *N. tabacum* sowie *H. perforatum* transferiert. Zur Regeneration stabil transformierter Pflanzen wurde zusätzlich ein Markergen für Kanamycinresistenz verwendet.

3.1. Amplifizierung der BPS für die Fusion mit GFP

Die beiden Fusionsvektoren pBSK:GFP-N bzw. -C (**Abb. 18**) wurden von Dr. R. Hänsch zur Verfügung gestellt. Die jeweils 4,8 kb großen Vektoren tragen das *gfp* unter Kontrolle des doppelten 35S Promotors und eine multiple Klonierungsstelle in C- bzw N-Stellung zum fluoreszierenden Protein. Für die Fusion waren die Erweiterung der BPS-Basensequenz um eine *NcoI*-Schnittstelle am aminoterminalen Ende und die Einführung einer Restriktionsstelle für *BglII* am C-Terminus erforderlich. Zur Amplifikation des Inserts wurden Primer mit den benötigten Schnittstellen erstellt. Der forward-Primer für beide Fusionen war dabei identisch (**Abb. 15a**). Er beinhaltet am Beginn die *NcoI*-Schnittstelle zur Klonierung in den Fusionsvektor und den Anfang der BPS-Basensequenz, wobei das Startcodon noch in der Schnittstelle liegt.

In der C-Fusion wurde die BPS an den C-Terminus des GFP angefügt (**Abb. 17**). Der reverse Primer für diese Fusion (C-Fus rev) enthält vor dem Stopcodon der *bps* die Sequenz der *BglII*-Restriktionsstelle (**Abb. 15b**). Für die N-Fusion war neben der Einführung der *BglII*-Schnittstelle die Entfernung des Stopcodons der *bps* erforderlich, damit das Fusionsprotein komplett expremiert werden konnte. Das entsprechende Basentriplett wurde durch das Glycin-Triplett tcc ersetzt (**Abb. 15c**).

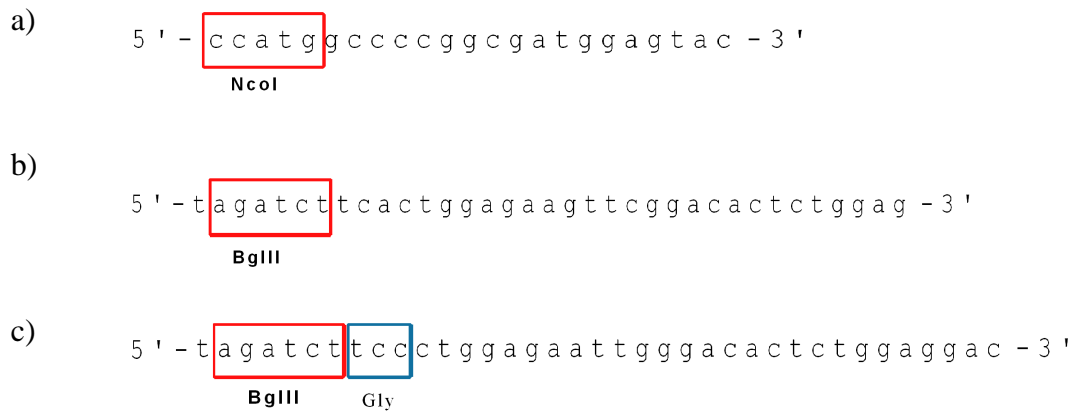


Abb. 15: Primer zur Amplifizierung der BPS mit Restriktionssequenzen zur Ligation in die Fusionsvektoren pBSK:GFP-N und -C. a) GFP-FUSforw mit der *NcoI* Schnittstelle. b) C-FUSrev mit *BglII* Schnittstelle. c) N-FUSrev mit *BglII* Schnittstelle und Glycin-Triplett anstelle des Stopcodons.

Aus dem Vektor pCK:BPS wurde unter Katalyse der korrekturlesenden Proof-reading *Pfu*-Polymerase je ein BPS-Fragment für die C- und N-Fusion mit den Fusionsprimern amplifiziert. Die Annealing-Temperatur in dieser Polymerasekettenreaktion lag bei 65,5 °C. In 30 Zyklen wurde die DNA mit einer Elongationszeit von je 2,5 min vervielfältigt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der beiden Reaktionsgemische (**Abb. 16**) wurden die 1200 bp großen Fragmente mit dem Gel-Extraktions-Kit der Firma MBI Fermentas aus dem Gel eluiert.

PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Fusions-Inserts:

10×Buffer complete	2,5 µl
C- bzw. N-FUSrev (10 µM)	1 µl
GFP-FUSforw (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10mM)	1 µl
<i>Pfu</i> (2,5 U/µl)	0,25 µl
pCK:BPS	0,5 µl
dH ₂ O	18,75 µl
Σ	25 µl

Thermocycler-Programm zur Amplifizierung der Fusions-Inserts:

Temperatur	Dauer	Zweck
95 °C	5 min	Initiale Denaturierung der Matrizen-DNA
95 °C	1 min	30 Zyklen Denaturierung der doppelsträngigen DNA Primer-Annealing Elongation
65,5 °C	1 min	
72 °C	2,5 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
12 °C	∞	Stoppen der Reaktion

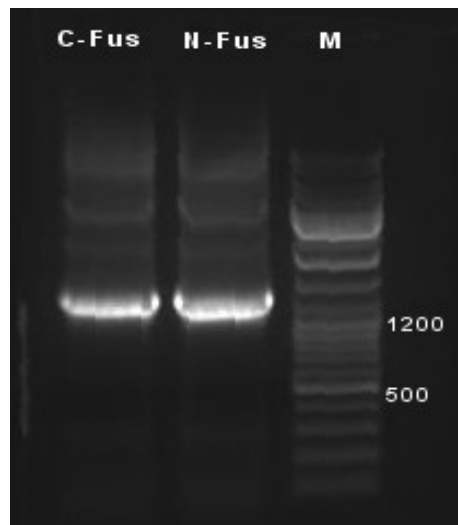


Abb. 16: Amplifikate der *bps* mit den Fusinsprimern aus pCK:BPS, M: DNA-Leiter.

3.2. Klonierung der Vektoren zur Fusion von GFP mit BPS

Durch korrekturlesende Polymerasen werden stumpfe Enden erzeugt, was bei der Ligation dazu führen kann, dass mehrere Inserts in die multiple Klonierungsstelle inserieren. Für die Ligation in pGEM[®]-Teasy mussten in einer weiteren Reaktion Adenosinreste an die DNA-Abschnitte angehängt werden (A-Tailing), um komplementäre Bereiche zu den T-Überhängen des Vektors zu schaffen. Dies erfolgte ebenfalls mit einer Polymerase-Reaktion, wobei dATP als einziges Nucleotid zugegeben wurde.

10 µl Ansatz des A-Tailings:

<i>Taq</i> -Puffer	1 µl
MgCl	0,2 µl
dATP (0,2 µM)	2 µl
PCR-Produkt	3 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ µl)	1 µl
dH ₂ O	2,5 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 70 °C inkubiert und die so gewonnene, verlängerte DNA zur Ligation in pGEM[®]-Teasy eingesetzt. Die Reaktion der T4-Ligase fand über Nacht bei 4 °C in einem Volumen von 10 µl statt.

Ligationsansatz:

Puffer	5 µl
pGEM [®] -Teasy	1 µl
BPS-Fragment	1 µl
T4-Ligase	1 µl
dH ₂ O	2 µl

Der Vektor wurde anschließend mittels Hitzeschock in DH5α-Zellen transferiert. Nach der Selektion weißer Klone und ihrer Vermehrung über Nacht erfolgte eine Plasmid-Minipräparation mit dem Nucleospin Kit (Macherey und Nagel). Die gewonnene DNA wurde photometrisch quantifiziert und je 2 µg eines Plasmids mit Insert für die C- und N-Fusion zur Sequenzierung mit dem Primer SP6 zu MWG Biotech (Ebersberg) geschickt. Auf dem zweiten Strang, mit dem T7 Primer, wurden die Plasmide im Institut für Pharmazeutische Biologie selber sequenziert. Als Matrize in der Sequenzier-PCR dienten jeweils 650 und 500 ng der Plasmide.

Das Ergebnis zeigte, dass der *bps*-ORF in vollständigem Zustand vorlag und die Schnittstellen erfolgreich angefügt wurden.

Die pGEM[®]-Teasy Plasmide, wie auch die Fusionsvektoren pBSK:GFP-N und -C, wurden in einem Doppelverdau mit *Bgl*II und *Nco*I geschnitten, um sie für die folgende Klonierung vorzubereiten.

*Bgl*III/*Nco*I-Verdau der pGEM[®]-Teasy:BPS-Vektoren:

10xPuffer	6 µl
pGEM [®] -Teasy:BPS-C/-N	10 µl (1 µg)
<i>Bgl</i> III	0,2 µl
<i>Nco</i> I	0,2 µl
dH ₂ O	13,6 µl
Σ	30 µl

*Bgl*III/*Nco*I-Verdau der GFP-Fusionsvektoren:

10xPuffer	6 µl
pBSK:GFP-N/GFP-C	2 µl (2 µg)
<i>Bgl</i> III	0,2 µl
<i>Nco</i> I	0,2 µl
dH ₂ O	21,6 µl
Σ	30 µl

Der Verdau fand über Nacht bei 37 °C statt und wurde am darauffolgenden Tag auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Extraktion der DNA aus dem Gel wurden die BPS-Fragmente in die multiple Klonierungsstelle der linearisierten Vektoren pBSK:GFP-N-Fus und pBSK:GFP-C-Fus ligiert (**Abb. 18**). So entstanden Fusionsgene, bei denen einmal die *bps* vor dem *gfp* (N-Fusion) und einmal dahinter (C-Fusion) liegt. Der Vektor wurde dann zur Vermehrung in DH5α kloniert. Nach über Nacht-Kultur der Bakterien in LB-Medium wurden je vier Plasmide der C- und N-Fusion mit einer CTAB-Minipräparation isoliert (pBSK:GFP-BPS-N1-4 und pBSK:GFP-BPS-C1-4). Zur Kontrolle erfolgte eine weitere Restriktion mit *Bgl*III/*Nco*I. Das Elektrophoresegel bestätigte in jedem Vektor ein 1200 bp großes Fragment, welches die *bps* darstellt.



Abb. 17: Genkassette der C-Fusion aus *gfp* und *bps* mit den Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle.

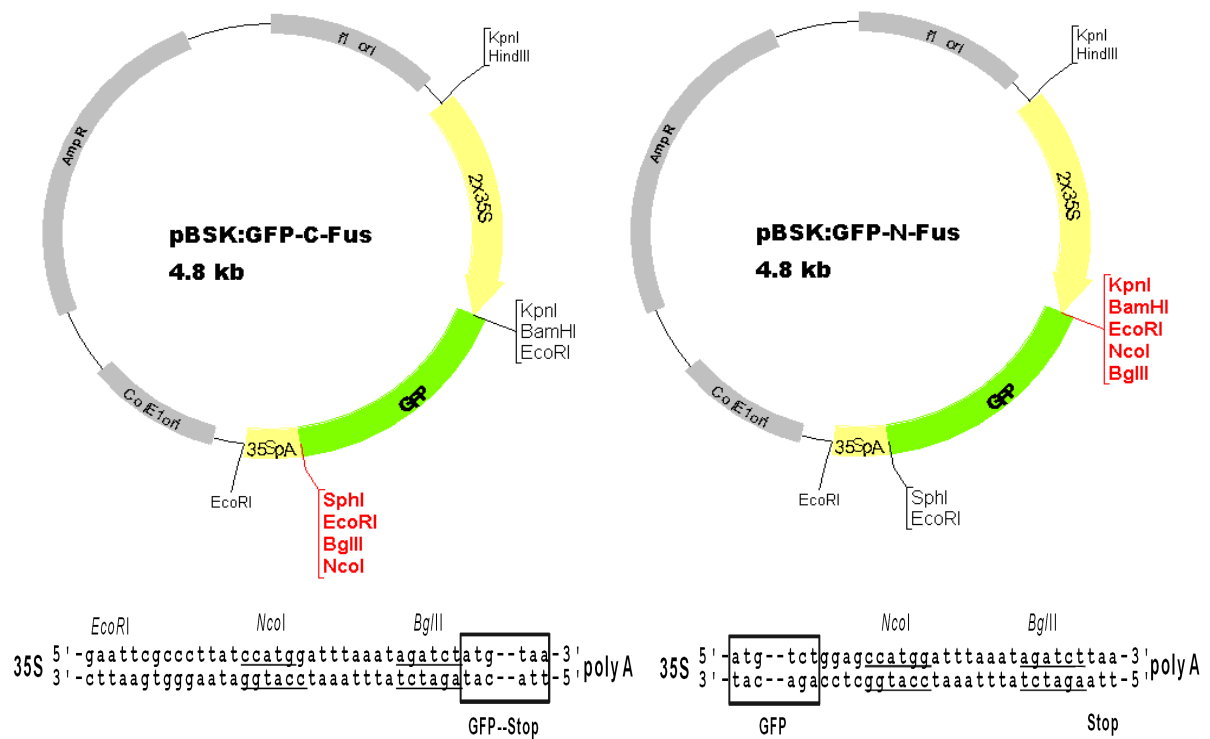


Abb. 18: pBSK:GFP-Fusionsvektoren mit multipler Klonierungsstelle, die unten jeweils vergrößert dargestellt ist (nach Nowak *et al.*, 2004).

3.3. Transformation mit der Partikelkanone und Detektion im cLSM

Verschiedene Pflanzenmaterialien wurden mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschossen. Einige Tage später erfolgte die Untersuchung der Proben mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop im Institut für Pflanzenbiologie.

3.3.1. Transformation von *N. tabacum*

Zunächst wurden die erstellten GFP-BPS Konstrukte in *N. tabacum* aus Erdkultur getestet. In zwei Coating-Ansätzen wurden einmal 13,3 µg (photometrisch gemessen) des Konstrukts BPS-GFP-N2 und einmal 10 µg BPS-GFP-C3 zusammen mit 2 µl pRTL2:DsRed (als Kontrolle der Transformation) auf die Goldpartikel gebracht. Die Tabakblätter wurden mit verschiedenen Drücken aus unterschiedlichen Abständen beschossen. Drei Tage später wurde das Gewebe unter dem cLSM bei 488nm Anregung mit der META Software ausgewertet.

In mehreren Zellen war die Fluoreszenz des GFP deutlich zu erkennen (**Abb. 19-22**). Beide GFP-BPS-Fusionsproteine wurden im Cytosol sowie im Zellkern beobachtet.

Abb. 19 A zeigt die rote Eigenfluoreszenz der Chloroplasten in einer Epidermiszelle, während alle anderen Wellenlängen hier ausgeblendet sind. In **Abb. 19 B** ist nur die Fluoreszenz des GFP im Cytoplasmaschlauch um die große Vakuole der Epidermiszelle dargestellt, wogegen im Teilbild **D** nur die Fluoreszenz des DsRed zu sehen ist. In **E** sind alle vorhergehenden Abbildungen sowie die Hellfeldaufnahme (**C**) überlagert, wobei zu erkennen ist, dass GFP und DsRed in den gleichen Kompartimenten exprimiert werden.

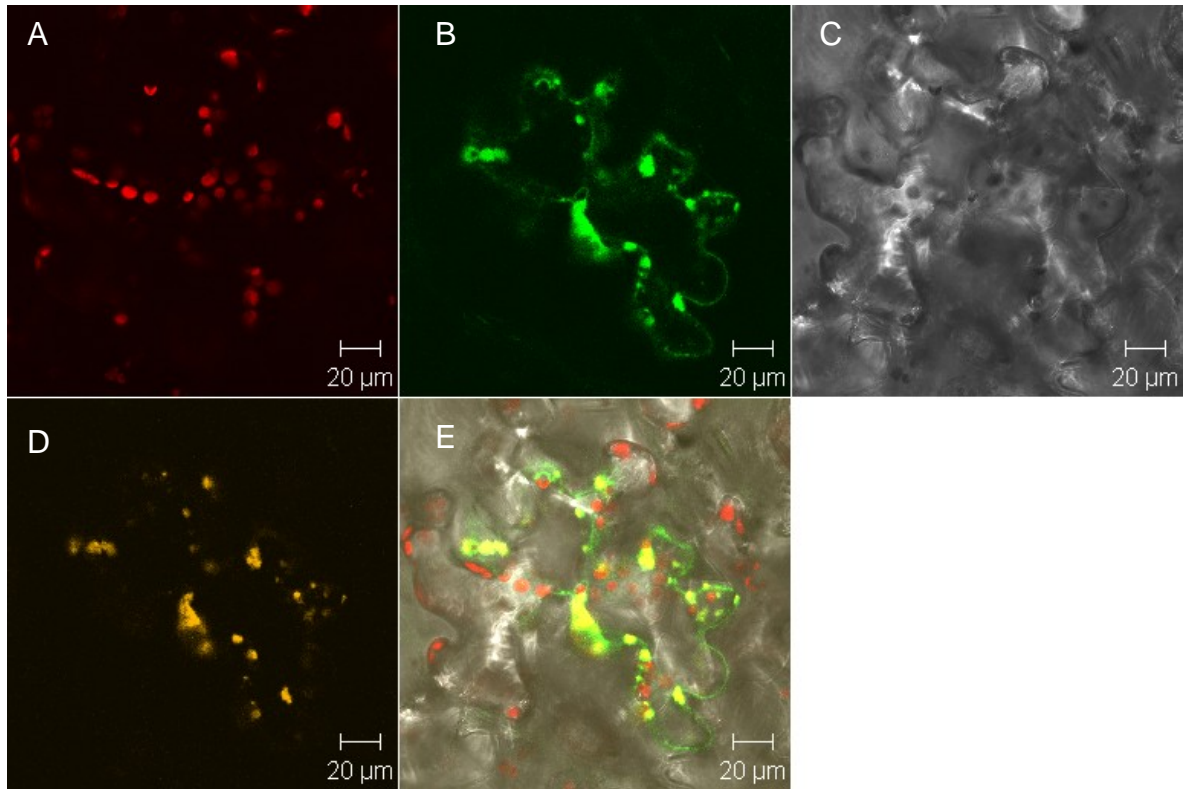


Abb. 19: *N. tabacum*-Epidermiszelle drei Tage nach Cotransformation mit pBSK:GFP-BPS-C3 und pRTL2:DsRed. A: Chlorophyllautofluoreszenz, B: Fluoreszenz des GFP im Cytoplasma, C: Hellfeld, D: DsRed-Fluoreszenz, E: A-D überlagert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einer Laserleistung von 6 % und bei 543 nm mit 49 % für DsRed. Detektion mit dem LSM 510 META, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

Es wurden verschiedene Emissions-Wellenlängen der transformierten Zellen aufgezeichnet, um die Identifikation des GFP zu ermöglichen. Zwischen 511 und 521 nm erscheint das Signal am kräftigsten (das Emissionsmaximum von GFP liegt bei 515 nm), dagegen ist es über 532 nm nicht mehr zu sehen (**Abb. 20**). Die gezeigte Zelle entspricht der aus der vorhergehenden Abbildung.

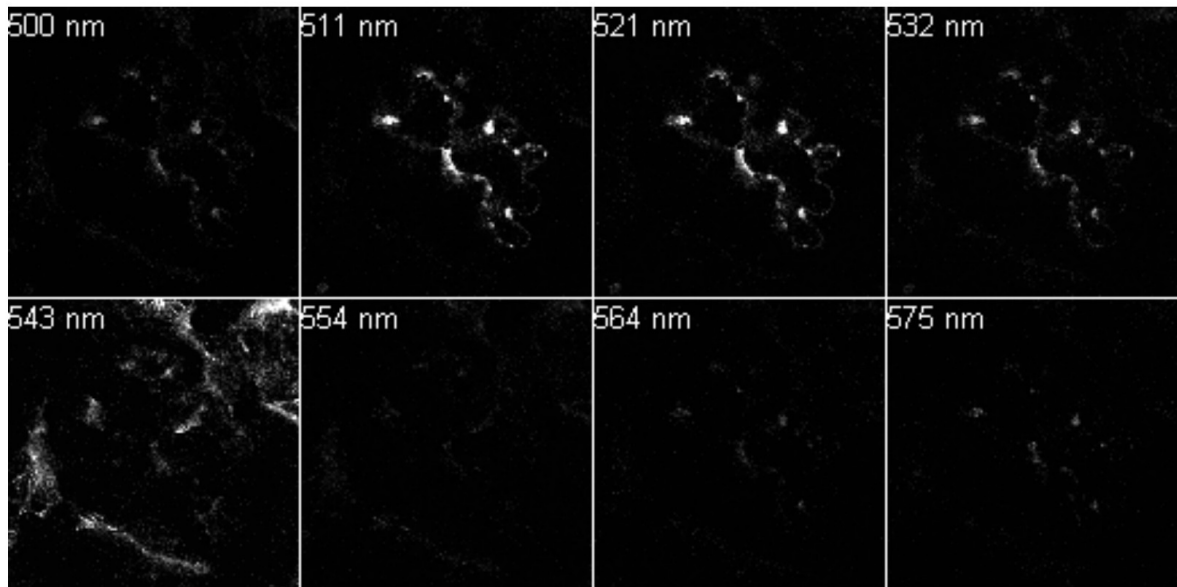


Abb. 20: Die in **Abb. 19** gezeigte transformierte Epidermiszelle bei verschiedenen Emissions-Wellenlängen. Anregung mit 488 nm bei 6 % Laserleistung und mit 543 nm bei 49 % Laserleistung. Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

In **Abb. 21** ist eine weitere transformierte Epidermiszelle aus *N. tabacum* abgebildet, bei der ebenfalls grüne Fluoreszenz im Cytoplasma und im Kern zu erkennen ist. Neben Epidermiszellen wurden auch Schließzellen von Goldpartikeln getroffen. **Abb. 22** zeigt eine Spaltöffnung, deren obere Zelle GFP exprimiert. In der Mitte der Zelle befindet sich der Zellkern, der durch eine Anreicherung von GFP markiert ist. Außerdem sind ebenfalls wieder Chloroplasten und die Vakuole zu erkennen.

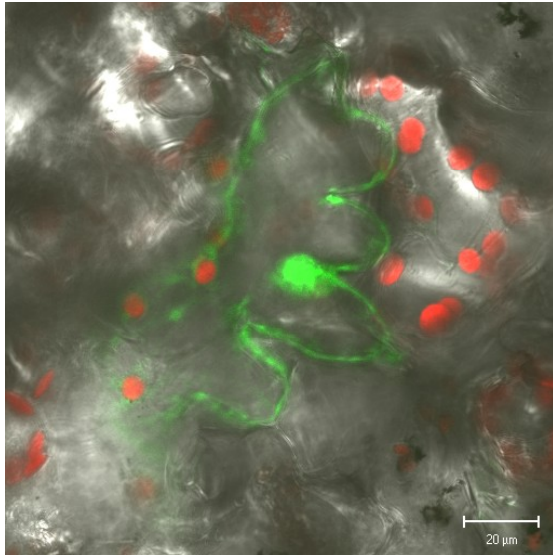


Abb. 21: Epidermiszelle von *N. tabacum* im cLSM, 3 Tage nach Transformation mit GFP-BPS-C3/dsRed. Das Cytoplasma wie auch der Zellkern zeigen grüne Fluoreszenz. Die Fluorochromanregung erfolgte mit 488 nm und 8 % Laserleistung. Detektion im LSM 510 META, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

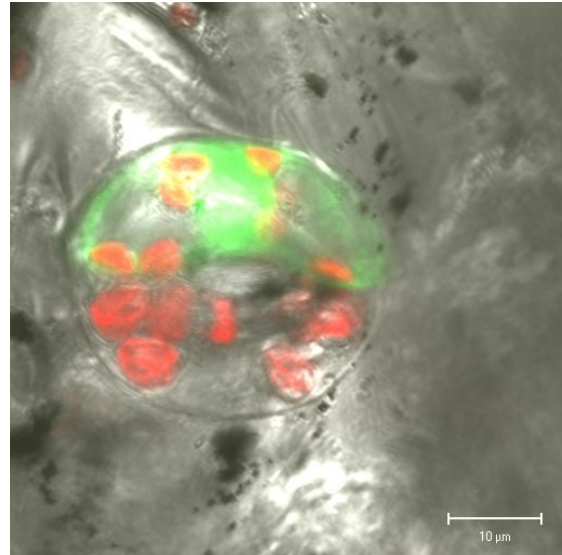


Abb. 22: Spaltöffnung von *N. tabacum* im cLSM. Die obere Zelle ist mit GFP-BPS-N2 transformiert. Im Zellkern und im Cytoplasma ist die Fluoreszenz des GFP zu erkennen. Fluorochromanregung erfolgte mit 488 nm und einer Laserleistung von 6 %, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

3.3.2. Transformation von *H. perforatum* mit verschiedenen Plasmiden

Um zu untersuchen, ob mittels Partikelkanone die Expression eines Fremdgens in *H. perforatum* zu erreichen ist, wurden verschiedene Konstrukte zunächst in Blätter und Internodien eingebracht. Dazu zählen die Fusionsgene GFP-BPS-N und -C (**Abb. 17**) sowie weitere, bereits an anderen Pflanzen in der Abteilung Mendel erfolgreich verwendete Plasmide mit Genen für fluoreszierende Proteine und Antibiotikaresistenzen.

Blattmaterial verschiedener Herkunft wurde zur Transformation eingesetzt. Neben Explantaten der *in vitro*-Sterilkulturen wurden Blätter aus dem Freiland verwendet, die vor dem Institut für Pharmazie, Mendelssohnstraße, geerntet wurden.

Das zu transformierende Gewebe wurde in Petrischalen auf mit autoklaviertem Leitungswasser getränktem Filterpapier ausgelegt und am darauffolgenden Tag mit der Partikelkanone beschossen. Zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Transformation wurde mit dem Laser Scanning Mikroskop auf Fluoreszenz untersucht.

Zur Transformation von Blättern wurden folgende Plasmide und Gene verwendet:

pBSK:GFP-BPS-N

pBSK:GFP-BPS-C

pBIN19:YFP-SKL

pGreen:GFP

pFF:GFP-PTS1

Mit den Fusions-Konstrukten GFP-BPS-N und -C sowie den Vektoren pBIN19:YFP-SKL und pGreen:GFP konnte keine transiente Expression der Fluoreszenzproteine im Johanniskraut nachgewiesen werden.

Der Vektor pFF, der GFP gekoppelt mit dem Peroxisomen-Targetingsignal PTS1 trägt, wurde ebenfalls in Blätter aus *in vitro*-Kultur geschossen und das Gewebe nach drei Tagen auf GFP-Expression untersucht. Bei Blättern, die mit 350 bar in der Position 0 beschossen wurden, waren in einigen Zellen die Peroxisomen durch grüne Fluoreszenz markiert. Epidermiszellen und Spaltöffnungszellen in Blättern von *H. perforatum* wurden getroffen und exprimierten GFP in den Zellorganellen (**Abb. 23-25**).

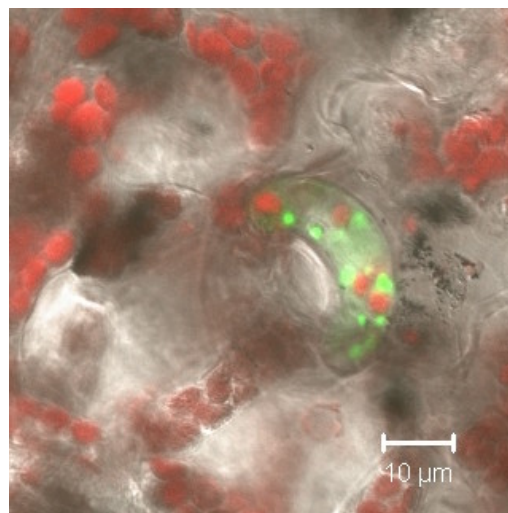


Abb. 23: GFP-markierte Peroxisomen in einer Spaltöffnungszelle von *H. perforatum* nach Transformation mit pFF:GFP-PTS1. Anregung mit 488 nm und 12 % Laserleistung, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

Abb. 24 zeigt, ähnlich wie **Abb. 19** für *N. tabacum*, Darstellungen in verschiedenen Kanälen. Während **A** die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls wiedergibt, sind in Teil **B** der Abbildung nur die GFP-markierten Peroxisomen in der hier gezeigten Epidermiszelle zu sehen. In der Überlagerung der drei Kanäle (**D**) ist zu erkennen, dass die markierten Organellen zu der auch im Hellfeld sichtbaren Epidermiszelle gehören.

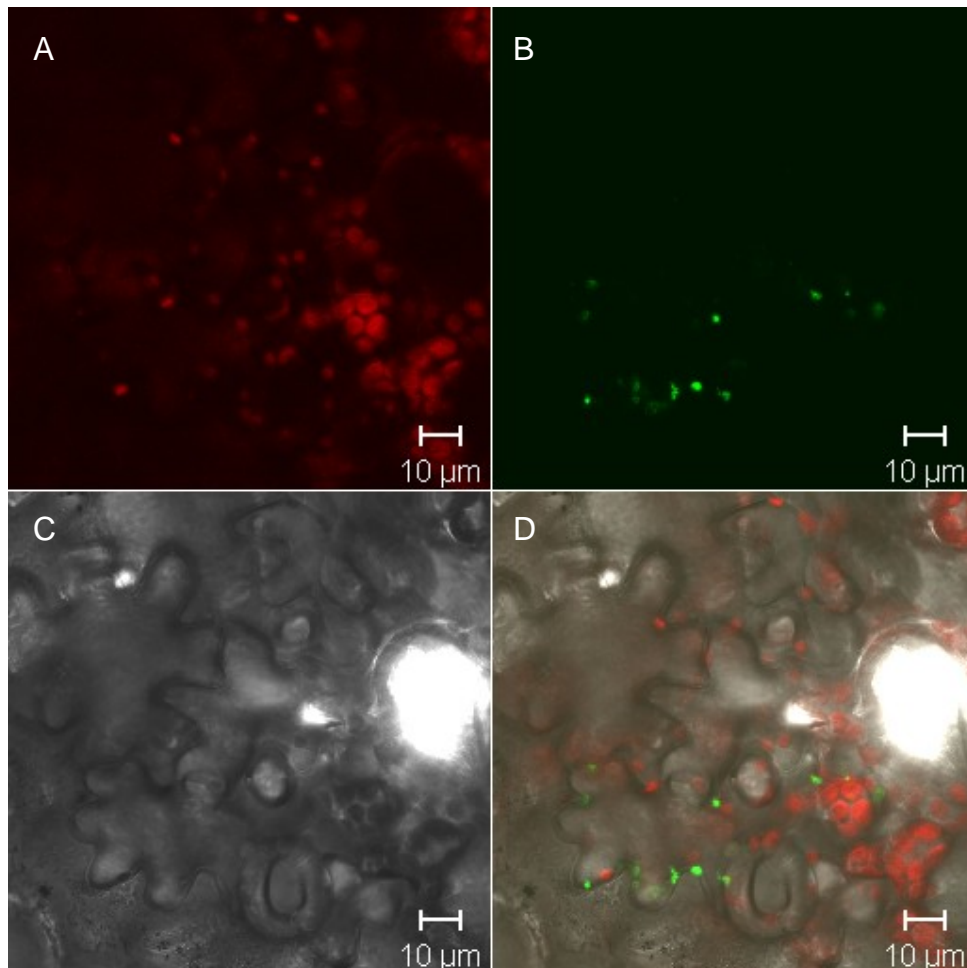


Abb. 24: Epidermiszelle mit GFP-markierten Peroxisomen in einem *H. perforatum*-Blatt. A: Chlorophylleigenfluoreszenz, B: GFP in den Peroxisomen, C: Hellfeld D: A-C überlagert. Anregung mit 488 nm bei 12 % Laserleistung, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr

Im Mikroskop zeigen die Abbauprodukte pflanzlichen Gewebes eine grüne Eigenfluoreszenz, was es teilweise schwierig macht, die spezifische GFP-Fluoreszenz mit dem Auge im Objekt davon zu unterscheiden. Dazu kommt, dass die Expressionsrate des GFP manchmal nicht so hoch ist, und die transformierten Zellen und Organellen deshalb kaum stärker als das umliegende Gewebe fluoreszieren. Zur eindeutigen Identifizierung

wurde die spektrale Signatur der Fluoreszenz aufgenommen (**Abb. 25**). Das Emissionsmaximum in den markierten Peroxisomen lag bei 515 nm und damit stammte die Fluoreszenz vom GFP.

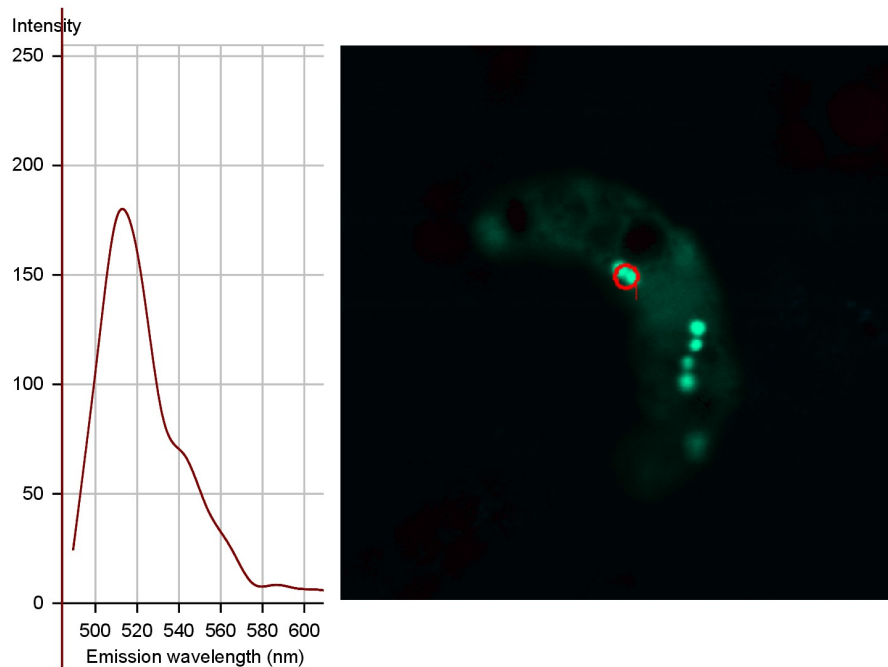


Abb. 25: Emissionsspektrum eines GFP-markierten Peroxisoms in einer Schließzelle von *H. perforatum*, Anregung der Fluorochrome erfolgte mit 488 nm und einer Laserleistung von 6 %, Objektiv: C-Apochromat 40x/1.2 W corr, Auswertung mit dem LSM 510 META

Der binäre Vektor pBIN19 wurde ebenfalls über die Goldpartikel in das Pflanzenmaterial gebracht. Aufgrund des *nptII*-Gens auf dem Vektor konnten putativ transformierte Sprosse auf Kanamycin selektiert werden. Drei Wochen nach der Behandlung in der Partikelkanone waren Sprosse regeneriert, die auf MS-Medium mit 50 mg/l Kanamycin gesetzt und alle zwei Wochen auf frisches Medium übertragen wurden. Nach mehreren Wochen Kultur auf Selektivmedium zeigte sich aber keiner der Sprosse als resistent.

3.3.3. Beschuss von Internodien

Internodien von *H. perforatum* wurden geschnitten und in der Mitte von Agarplatten mit Regenerationsmedium dicht aneinander ausgelegt.

Dann wurden sie mit verschiedenen Konstrukten transformiert:

pBIN19:YFP-SKL

pBIN19:Kana

pRT99gus in Cotransformation mit GFP

Dabei wurde jede Probe zweimal mit unterschiedlichen Drücken beschossen. Drei bis fünf Tage nach der Transformation wurden die mit GFP bzw. YFP transformierten Internodien im Laser Scanning Mikroskop untersucht, wobei jedoch keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Die mit Kanamycinresistenz-Genen transformierten Stängelstücke wurden nach Entstehen neuer Sprosse auf Selektivmedium übertragen. Nach vier bis sechs Wochen auf diesem Medium erwies sich keine der regenerierten Pflanzen als Kanamycin-resistent.

3.3.4. Arbeiten an einer Zellkultur von *H. perforatum* cv. Helos

Die Suspensionskultur enthielt viele größere Zellaggregate. Die feineren Zellansammlungen wurden abgetrennt und zunächst einige Tage in frischem Medium kultiviert, bevor sie auf Filterpaper aufgetragen wurden. Diese Papierscheiben wurden auf MS-Agar-Platten gelegt und die Zellaggregate am nächsten Tag mit verschiedenen Plasmiden beschossen. Hier wurden die Plasmide pBIN:GFP-SKL in Cotransformation mit pCK:Kana, bzw. pCK:Kana allein, pRT99 zusammen mit pFF:GFP-PTS1 und der Binärvektor aus der Agrobakterien-vermittelten Transformation, pBIN19:BPS, verwendet.

Wie auch bei den vorhergehenden Proben wurde nach drei bis fünf Tagen mit dem Laser Scanning Mikroskop auf transiente Expression der Fluoreszenzproteine untersucht. Da die Petrischalen zur Detektion mit dem Mikroskop geöffnet werden mussten, wurden nicht alle Platten angeschaut, um die Gefahr der Kontamination möglichst gering zu halten. In den untersuchten Aggregaten konnten Zellen mit fluoreszenzmarkierten Peroxisomen detektiert werden (**Abb. 26 und 27**), woraufhin alle beschossenen Zellaggregate desselben Ansatzes weiter kultiviert wurden.

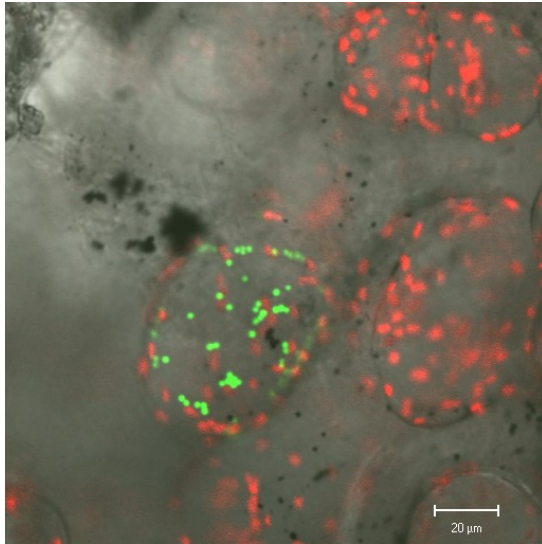


Abb. 26: GFP-markierte Peroxisomen und eigenfluoreszierende Chloroplasten in kultivierten Zellen von *H. perforatum* cv. Helos. Fluorochromanregung mit 10 % Laserleistung bei 488 nm, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3

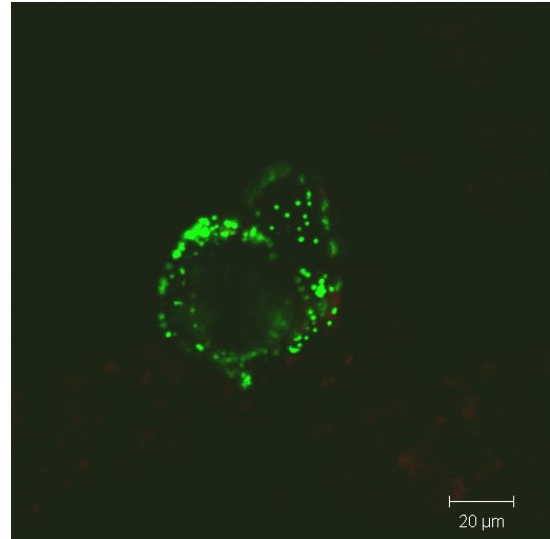


Abb. 27: GFP-markierte Peroxisomen in einer Zelle der Suspensionskultur von *H. perforatum* cv. Helos. Anregung mit 488 nm bei einer Laserleistung von 10 %, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3

Abb. 28 zeigt das Emissionsmaximum der Fluoreszenz in den Peroxisomen der in **Abb. 27** gezeigten transformierten Zelle. Die maximale Emission lag bei einer Wellenlänge von 515 nm, dem für GFP typischen Emissionsmaximum.

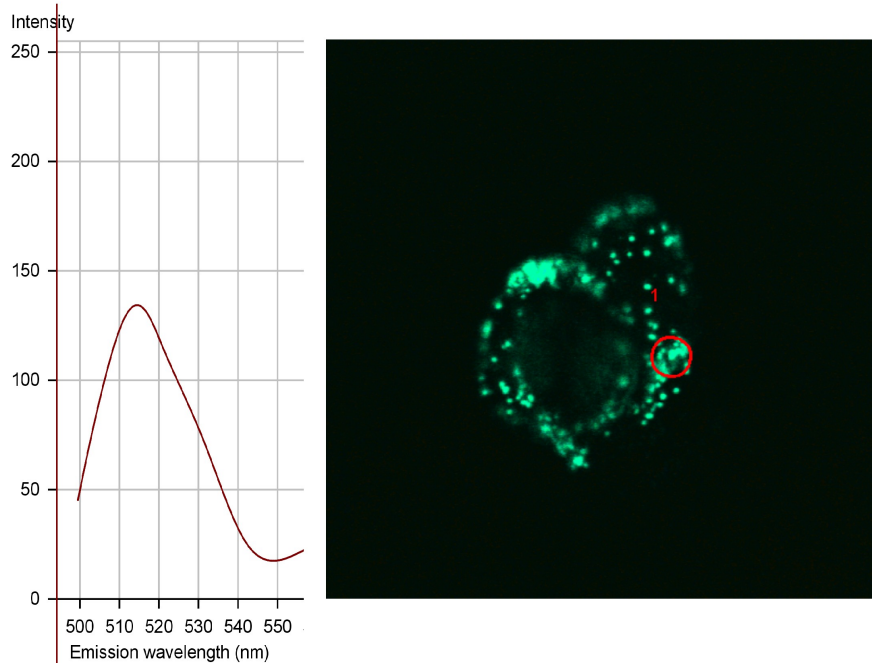


Abb. 28: Spektrale Signatur der Fluoreszenz in Peroxisomen einer kultivierten Zelle von *H. perforatum* cv. Helos nach Transformation mit pFF:PTS1-GFP. Fluorochromanregung mit 488 nm bei 9,9 % Laserleistung, Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3

Sieben Tage nach der Transformation wurden die Filterpapiere mit den Zellaggregaten auf MS-Medium mit Kanamycin (50 mg/l) übertragen. Die einzelnen Zellaggregate wuchsen auf dem Filterpapier weiter, wobei mit der Zeit einige grüne Kalli und auch kleine Sprosse beobachtet wurden. Nach 18 Tagen wurde die Kanamycin-Konzentration auf 100 mg/l erhöht.

Sechs Wochen nach der Transformation waren unter der erhöhten Antibiotikumkonzentration nur noch wenige grünliche Kalli sowie einige hellgrüne Sprosse auf den Agarplatten übrig (**Abb. 29**). Die restlichen Zellhaufen verfärbten sich braun und gingen ein. Die grünen Bestandteile wurden dann auf Antibiotikum-freies Regenerationsmedium übertragen. Dennoch starben alle regenerierten Sprosse innerhalb der nächsten zwei Monate ab.

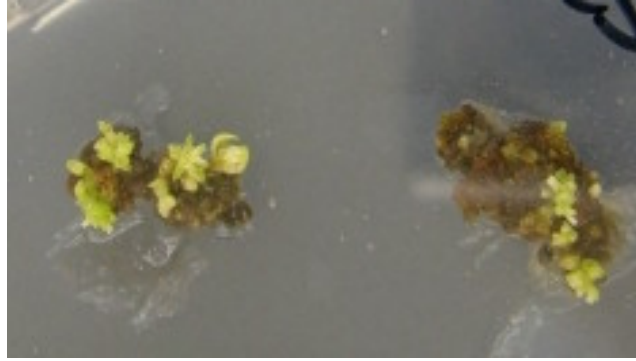


Abb. 29: Regeneration von Sprossen aus kultivierten Zellaggregaten von *H. perforatum* cv. Helos sechs Wochen nach Transformation mit pRT99/KanR

4. Wirkung von *H. perforatum*-Extrakten auf Agrobakterien

Die Wirkung von *H. perforatum* auf Agrobakterien wurde mit einem einfachen Hemmtest gezeigt. Eine Agrobaktériensuspension wurde auf die mit methanolischem Extrakt aus *H. perforatum* getränkten Zellstoffplättchen und die gesamte Agar-Platte aufgesprüht. Direkt auf den Zellstoffplättchen konnten keine Bakterien wachsen. Außerdem zeigte sich um die Plättchen herum ein kleiner aber deutlicher Hemmhof (**Abb. 30**). Die übrige Fläche der Petrischale war von einem dichten Bakterienrasen überzogen.

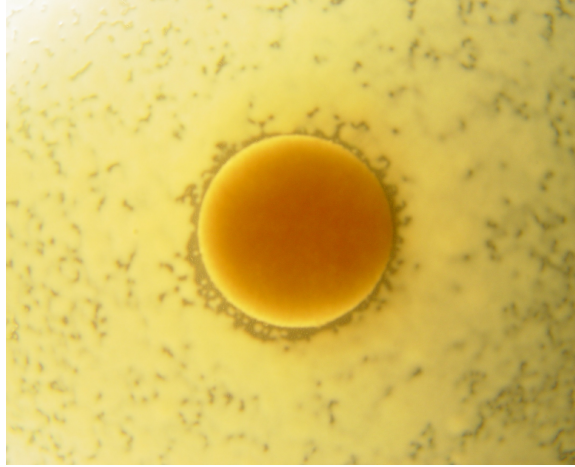


Abb. 30: Hemmtest mit methanolischem Auszug aus *H. perforatum* mit *A. tumefaciens*.

5. Untersuchung auf Endonuklease-Aktivität

Es sollte getestet werden, ob *H. perforatum* Inhaltsstoffe besitzt, die ungeschützte DNA spalten können. Dazu wurde das auch in der Transformation benutzte Plasmid pBSK:GFP-BPS-C4 mit verschiedenen Blattextrakten nach II.8.2 inkubiert.

Die DNA wurde mit Extrakten aus *N. tabacum*- und *H. perforatum*-Blättern versetzt. Aus den *H. perforatum*-Pflanzen aus dem Freiland und den separierten Internodien konnte nicht genug Rohprotein isoliert werden, so dass hier nur Blattextrakte aus *in vitro*-Kulturen zum Einsatz kamen. Zur Auswertung wurden die Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Vektor pBSK:GFP-BPS-C4 war in den drei Untersuchungslösungen in verschiedenem Grad abgebaut (**Abb. 31**).

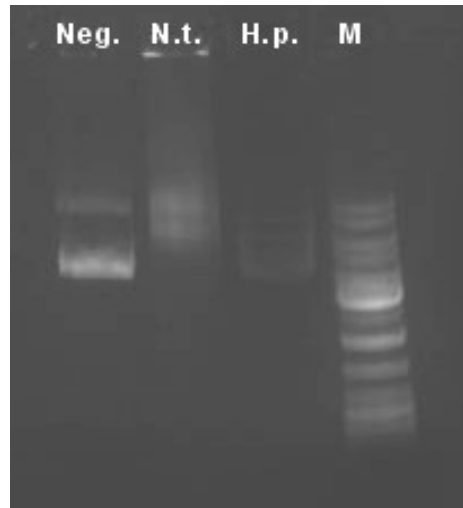


Abb. 31: Endonucleasetest Neg: 3 μ l des ungeschnittenen Vektors pBSK:GFP-BPS-C4, N.t.: 3 μ l Vektor mit 25 μ g Rohprotein aus *N. tabacum*-Blättern, H.p.: 3 μ l Vektor mit Rohprotein aus *H. perforatum*-Blättern. M: DNA-Leiter

Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C war der Vektor ohne Zugabe von Blattextrakten in ein rund 1,4 kb großes Fragment und einen Rest von 3 kb aufgespalten worden. Unter der Wirkung des Extraktes aus *N. tabacum*-Blättern ist keine klare Bande mehr zu erkennen. Der Vektor war in einzelne Stücke zerteilt worden, die nur einen Schmier von Fragmenten verschiedener Größe auf dem Gel ergeben. Die Intensität der Fluoreszenz ist etwas schwächer als die des ersten Ansatzes ohne Blattextrakte. Die dritte Spur zeigt den Vektor nach Inkubation mit *H. perforatum*-Blattextrakt. Das Signal auf dem Gel ist erheblich schwächer als bei den anderen Ansätzen und zeigt keine klare Bande oder stärker fluoreszierenden Bereiche.

Durch die Proteine aus *N. tabacum* wird die Plasmid-DNA ein wenig abgebaut. Es ergibt sich keine klare Bande mehr. In der mit Rohprotein aus *H. perforatum* behandelten Probe ist die ursprünglich eingesetzte DNA so weit abgebaut, dass sie kaum noch zu erkennen ist.

IV. Diskussion

1. Gentransfer in Pflanzen

Konventionelle Pflanzenzüchtung sowie genetische Techniken auf Zellkulturebene sind durch Kreuzungsbarrieren zwischen den Taxa begrenzt. In der klassischen Züchtung lassen sich nur Individuen einer Art miteinander kreuzen, so dass das Spektrum der zu nutzenden Gene auf die der einen Art beschränkt ist. Durch die Transformation pflanzlichen Gewebes werden diese Barrieren überwunden. Es sind verschiedene Wege bekannt, um fremde DNA fast beliebigen Ursprungs in Pflanzen zu transferieren.

Viele veröffentlichte Transformationsmethoden erfüllen jedoch nicht alle Kriterien, die eine verlässliche und technisch umsetzbare Methode ausmachen (Birch, 1997). Die heute bekannten Methoden, die in vielen Laboren reproduzierbar transgene Pflanzen hervorbringen, sind *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer, Partikelbombardement mit DNA-überzogenen Mikropartikeln und Transformation von Protoplasten durch Elektroporation oder mit Hilfe von PEG. Dabei ist jedoch die Gewinnung von Protoplasten mit einigem Aufwand verbunden und bis heute bei weitem nicht bei allen Pflanzen routinemäßig möglich. Dazu kommen die Probleme der Regeneration von ganzen Pflanzen aus den einzelnen Zellen.

Um eine stabile Transformation zu belegen, muss die fremde DNA im Genom der Empfängerpflanze nachgewiesen werden (Mendel und Hänsch, 1995). Als allgemein anerkannte Methode gilt die Analyse mehrerer unabhängiger Transformanten in einem Southern-Blot. Die Hybridisierung mit einer Sonde für das eingeführte Gen liefert gleichzeitig Informationen über die Kopienzahl des Fremdgens. Als weiteres Argument für eine erfolgreiche Transformation wird ein neuer Phänotyp und ein messbares Genprodukt in allen im Southern-Blot positiv getesteten Linien gefordert (Birch, 1997). Einige Wissenschaftler halten die Vererbung des Transgens an die Nachkommen für einen weiteren notwendigen Beweis, was aber bei Pflanzen mit einer langen Generationszeit nur schwer umsetzbar ist.

1.1. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer

Die Transformation mittels Agrobakterien war die erste erfolgreich durchgeführte Methode zur Integration fremder Gene in Pflanzen. Durch die Arbeiten von Schell und Van Montagu in den 70er und zu Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts (Mendel und Hänsch, 1995) wurde bekannt, dass die Bakterien einen Teil ihres Megaplasmid (Ti-Plasmid) in das Genom der Wirtspflanze integrieren können, was diese veranlasst spezielle Aminosäuren (Opine) und Wachstumsregulatoren zu synthetisieren. Aus den infizierten Zellen entstehen pflanzliche Tumorzellen, die später auch ohne die Anwesenheit der Bakterien ihr Wachstum fortsetzen. Das übertragene Stück genetischen Materials, die Transfer-DNA (T-DNA), wird von zwei konservierten 25 bp-Bordersequenzen flankiert. Um dieses System für die pflanzliche Gentechnik nutzen zu können, mussten die Tumor-induzierenden Gene und diejenigen zur Opinsynthese von der T-DNA entfernt werden. Heute ist eine Vielzahl nicht Tumor-induzierender Agrobakterien erhältlich, in deren Plasmide beliebige Gene zwischen die 25 bp-Grenzen eingefügt werden können. Die Virulenz-Gene (*vir*-Gene) liegen im Wildtyp der Bakterien zusammen mit der T-DNA auf dem Ti-Plasmid. Für die Gentechnik wurden kleinere Vektoren entwickelt, auf denen sich die rechte und linke Grenze mit den zu transformierenden Genen befinden. Außerhalb der Grenzen befinden sich jeweils ein Replikationsursprung für *E. coli* und *Agrobacterium* und Selektionsmarkergene für die beiden Bakterienarten. Die *vir*-Gene liegen bei diesem System auf einem zweiten Plasmid und leiten von dort aus den Transformationsprozess ein. Dieses sogenannte binäre Vektorsystem ermöglicht es, alle Klonierungsschritte in *E. coli* durchzuführen und das Plasmid mit der T-DNA anschließend in *Agrobacterium* zu übertragen.

Für eine erfolgreiche Transformation benötigt man zunächst regenerationsfähiges Pflanzenmaterial. Des weiteren braucht man eine Methode, um die Fremd-DNA in dieses Zellmaterial einzuführen und letztlich ein Selektions- und Regenerationssystem, das transformierte Pflanzen in befriedigender Menge hervorbringt (Birch, 1997).

Die Infektion und Transformation einer Pflanzenzelle verläuft in mehreren essentiellen Schritten, die im folgenden dargestellt werden (nach de la Riva *et al.*, 1998):

1. Die bakterielle Kolonisation des pflanzlichen Gewebes. In diesem ersten Schritt heften sich die Bakterien an die Oberfläche der Pflanzenzellen an. Dabei spielen anscheinend die Polysaccharide auf der Bakterienoberfläche eine Rolle. Die an diesem Schritt beteiligten Gene liegen chromosomal auf dem *att* Locus.

2. Induktion der *vir*-Gene. Der Transfer der T-DNA wird durch die Produkte der *vir*-Region auf dem Ti-Plasmid vermittelt. Dieser 10-40 kb große Bereich enthält mehrere Operone mit unterschiedlich vielen Virulenz-Genen. VirA ist ein sensorisches Transmembranprotein, welches die von der verletzten Pflanzenzelle ausgeschiedenen Substanzen, vor allem Acetosyringon, registriert (Pan *et al.*, 1993). Zusammen mit dem cytoplasmatischen DNA-bindenden Protein VirG bildet es ein regulatorisches Zwei-Komponenten-System zur Aktivierung der übrigen *vir*-Gene. Bei Anwesenheit der entsprechenden phenolischen Signalverbindungen und einigen Zuckern autophosphoryliert VirA in Koordination mit dem Monosaccharidtransporter ChvE und überträgt das Phosphat anschließend auf VirG, welches dadurch aktiviert wird (Jin *et al.*, 1990). Mit dem C-terminalen Ende bindet VirG als Transkriptionsaktivator an die regulatorischen Elemente der anderen *vir*-Operone.

3. Bildung des T-DNA-Transferkomplexes. VirD1 und VirD2 erkennen die Bordersequenzen um die T-DNA und schneiden mit ihrer Endonucleaseaktivität den unteren DNA-Strang heraus, welcher dann als single-strand DNA vorliegt. VirD2 bleibt kovalent am 5'-Ende des Einzelstranges (T-Strang) gebunden und schützt diesen dadurch vor dem Abbau durch weitere Endonucleasen. Später ist das Protein vermutlich auch an der Aufnahme in den pflanzlichen Zellkern sowie an der Integration der Fremd-DNA in das Wirtsgenom beteiligt.

4. Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle. Hier kommt es zu einem Zusammenspiel vieler *vir*-Gene. Der ssT-DNA-Protein-Komplex muss durch zwei Membranen, die bakterielle und pflanzliche Zellwand und den subzellulären Raum geschleust werden. VirB2 zusammen mit VirB5 und möglicherweise auch VirB7 bilden einen Pilus aus, dessen Aufgabe jedoch noch nicht abschließend geklärt ist. Denkbar wäre eine Kanalfunktion zum Transfer der T-DNA und der benötigten Vir-Proteine. Vielleicht bildet er aber auch eine Art Anker, um die pflanzliche Empfängerzelle und das Bakterium in geringer Entfernung voneinander zu halten. Zudem scheinen die VirB-Proteine als ATPasen zu wirken um Energie für den Transport zu liefern (Gelvin, 2003).

Die T-DNA liegt in der Pflanzenzelle von mehreren VirE2-Molekülen umschlossen vor, wobei noch nicht geklärt ist, ob dieser sogenannte „T-Komplex“ schon in der Bakterienzelle gebildet wird oder erst in der Wirtszelle. In beiden Fällen müssen die beiden Elemente in die Pflanzenzelle gebracht werden. In der Wirtszelle ändert VirE2 die Konformation der ssT-DNA in eine einfach gewundene Spirale (Citovsky *et al.*, 1997), die leichter durch die Kernporen geleitet werden kann.

5. Integration der T-DNA in das Wirtsgenom. In der Pflanzenzelle wird die T-DNA in den Kern geschleust. Neben VirD2 und wahrscheinlich VirE2 sind auch VirF sowie ein pflanzliches NLS-Bindungsprotein an diesem Prozess beteiligt. An dem T-DNA-VirE2-Komplex hängt ein VirD2-Molekül mit einem NLS (Nukleus Lokalisierungs-Signal). Jedes der bis zu 600 VirE2-Moleküle enthält zwei Kernlokalisierungssequenzen, deren Aufgabe noch nicht bekannt ist. Möglicherweise helfen sie im Verlauf des Transfers die Kernporen offen zu halten, um die ununterbrochene Aufnahme der T-DNA in den Zellkern zu ermöglichen (Zupan *et al.*, 2000).

Der Mechanismus der Integration ins Wirtsgenom ist noch nicht geklärt, erfolgt jedoch wahrscheinlich über illegitime oder nicht-homologe Rekombination. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die T-DNA als Doppelstrang in das Wirtsgenoms eingebaut wird (Lacroix *et al.*, 2006). Die Fremd-DNA wird als Doppelstrangbruch erkannt und mit Hilfe der pflanzlichen Reparaturmechanismen integriert (Li *et al.*, 2005). Da in transkriptionell aktiven Bereichen und dekondensiertem Chromatin häufiger Doppelstrangbrüche in der DNA auftreten, findet die Integration bevorzugt in diesen Bereichen statt (Alonso *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2003). Ob bakterielle Proteine überhaupt an diesem Vorgang beteiligt sind ist unklar. Für VirE2 wird eine Helikasefunktion angenommen (Steinbiß, 1995), die bei der Umwandlung in einen Doppelstrang wichtig sein kann. Vor der Integration wird VirE2 allerdings mit Hilfe von VirF wenigstens teilweise abgespalten (Lacroix *et al.*, 2006).

Die Expression der integrierten Gene korreliert nicht direkt mit der Menge der Transgene. Als Grund hierfür werden oft Positionseffekte genannt. Die DNA kann in der Nähe oder in größerer Entfernung zu Faktoren wie Enhancern oder Silencern eingebaut werden und unterliegt dann mehr oder weniger dem Einfluss dieser Elemente. Zudem sind die Bereiche eines Genoms unterschiedlich aktiv, auch wenn bevorzugt, wie oben erwähnt, in transkriptionell aktive Bereiche integriert wird. Versuche, die T-DNA in bekannte Bereiche des Genoms zu integrieren, waren bislang ohne große Erfolge oder die erwarteten

Effekte blieben aus. Viele Transgen-silencing-Ereignisse erwiesen sich als posttranskriptionelle Veränderungen, die häufig mit mehreren Kopien des Transgens in einer Zelle oder instabiler RNA einhergingen (Meins, 2000). Auch wenn in Agrobakterien-vermittelter Transformation die Zahl der integrierten Gene im Vergleich zu Methoden des direkten Gentransfers geringer ist, so kommt es doch vor, dass zwei oder seltener auch mehr Kopien an derselben Stelle integrieren (Jorgensen *et al.*, 1987).

Die erfolgreiche Transformation mit Agrobakterien ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören die unterschiedlichen genetischen Gegebenheiten der Bakterien selbst sowie einige physiologische und die Umgebung betreffende Faktoren. Aber auch pflanzliche Proteine spielen eine Rolle in den verschiedenen Schritten der Agrobakterien-Infektion und T-DNA Integration (Gelvin, 2000).

Ballas und Citovsky (1997) zeigten, dass VirD2 sowohl im yeast-two-hybrid System als auch *in vitro* mit Importin- α 1 (AtKAP) reagiert. In Eukaryonten sind Importin- α -Proteine am Transport vieler Proteine mit Kernlokalisierungssignalen beteiligt. Als weitere mit VirD2 interagierende pflanzliche Komponente konnte Cyclophilin identifiziert werden (Deng *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass Cyclophilin als eine Art Chaperon dient und daran beteiligt ist, den T-Komplex durch die Zelle zum Nukleus zu schleusen. Des weiteren wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen Proteine gefunden, die mit VirD2, VirE2 und VirF kooperieren und deren Überexpression bzw. Abschalten Effekte auf die Transformationsrate zeigte (Gelvin, 2003). Untersuchungen an Arabidopsis *rat*-Mutanten (resistant to Agrobacterium transformation) weisen auf die Beteiligung einiger Histone an Agrobakterien-vermittelter Transformation hin (Nam *et al.*, 1999).

Viele Pflanzen zeigen höhere Transformationsraten, wenn sie zuvor mit Wachstumsregulatoren behandelt wurden. Das lässt einen Zusammenhang der Transformation mit den Stadien des Zellzyklus vermuten. Villemont *et al.* (1997) stellen auf Grund ihrer Untersuchungen dar, dass T-DNA während der DNA-Synthese in die Zellen aufgenommen, zum Kern transportiert und transient exprimiert werden kann. Dazu bedarf es keiner Zellteilung. Dagegen sind die Integration der T-DNA und die Stabilisierung der Transformation nur während der Zellteilung möglich. Eine andere mögliche Interpretation ihrer Ergebnisse besagt, dass die Aufnahme und Translokation der DNA zum Kern unabhängig von der Synthese stattfindet und dass die S-Phase erst zum Umwandeln der einsträngigen DNA in einen transkriptionskompetenten Doppelstrang benötigt wird (Gelvin, 2000).

Agrobacterium vermag viele verschiedene Spezies, unter anderem auch Gymnospermen, Pilze und tierische Zellen zumindest transient zu transformieren. Es lassen sich jedoch längst nicht alle Pflanzen mit dieser Methode stabil transformieren. In vielen beschriebenen Fällen von nicht zu transformierenden Pflanzen scheint der Transfer der T-DNA in die Pflanze jedoch nicht das Problem zu sein, sondern die anschließende Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom. Darauf deuten die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen hin, die eine transiente Expression von Fremdgenen in verschiedensten Arten nachweisen konnten, aber keine stabile Integration dieser Gene (Ke *et al.*, 2001, Ritchie *et al.*, 1993).

Auch monokotyle Arten, zu denen die wirtschaftlich bedeutenden Getreide Reis und Mais zählen, sind in der Regel für Agrobakterien unempfindlich. Vermutlich, weil sie nicht dem natürlichen Wirtsspektrum der Bakterien angehören, und die Wundreaktion dieser Pflanzen sehr verschieden ist. Durch die Zugabe von Acetosyringon können einige dieser Pflanzen aber heute mittels Agrobakterien transformiert werden. Andere Pflanzen dagegen lassen sich auf Grund mangelnder Regenerationsfähigkeit nicht transformieren. Dieses Problem betrifft allerdings nicht nur die Agrobakterien-vermittelte Transformation, sondern stellt eine generelle Hürde in der Pflanzengentechnik dar. Die Regeneration von ganzen, stabil transformierten Pflanzen ist zum Teil nur mit aufwendigen Kultivierungsmethoden zu erreichen.

1.2. Direkter Gentransfer durch Mikroprojekte

Im Jahr 1987 wurde von Sanford eine Methode entwickelt, mit der Nukleinsäuren mit Hilfe von Mikropartikeln (Gold oder Wolfram) in pflanzliches Gewebe eingebracht werden können. Die mit DNA oder RNA überzogenen Partikel werden auf 1,5 fache Schallgeschwindigkeit beschleunigt und das Gewebe damit beschossen. Nach dem Eintritt in die Pflanzenzelle können die Mikropartikel verschiedene Organellen treffen, oder im Cytoplasma bleiben. Dort löst sich die DNA von den Partikeln ab und wird, nachdem sie in den Zellkern gelangt ist, transkribiert. Unter Umständen erfolgt die Integration der Fremd-DNA an zufälligen Stellen in das Genom der Pflanze. Ist das nicht der Fall, wird die fremde DNA erkannt und abgebaut. Bis sie vollständig entfernt ist, können jedoch die Produkte der Fremdgene nachgewiesen werden. Man spricht dann von transienter oder vorübergehender Fremdgen-Expression.

Der direkte Gentransfer ermöglicht die Transformation von Pflanzen, die nicht anfällig für Agrobakterien sind. Im Gegensatz zur Transformation von Protoplasten kann ausdifferenziertes Gewebe eingesetzt werden. Das ermöglicht die Regeneration ganzer Pflanzen aus Spezies, deren Protoplastenkultur nicht oder nur unter erheblichem Aufwand möglich ist. Zu den mit Partikelbeschuss erfolgreich transformierten monokotylen Pflanzen zählen unter anderem Mais (Fromm *et al.*, 1990), Reis (Christou *et al.*, 1991) und Weizen (Vasil *et al.*, 1991).

Der Erfolg dieser als Biolistik (= biologische Ballistik) bezeichnete Methode ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Größe, Anzahl und Geschwindigkeit der Partikel sowie die Art des Beladens mit DNA beeinflussen die Transformation ebenso wie die Auswahl des Zielgewebes. Es können Zellen und Gewebe unterschiedlicher Herkunft und Größe eingesetzt werden, wobei der physiologische Zustand und das Alter des Empfängerorgans ebenfalls eine Rolle spielen können (Mendel und Hänsch, 1995). Die Zellen werden bei dieser Methode durch die Metallpartikel leicht beschädigt, was in gewissem Maße auch gewollt ist, um die Regeneration der getroffenen Zellen anzuregen. Jedoch verträgt nicht jedes pflanzliche Gewebe diese Behandlung gleich gut. Durch Veränderung der Geschwindigkeit der Partikel und der Entfernung zum Objekt ist es möglich, verschiedene Schichten im Gewebe zu erreichen, doch nicht alle Zellschichten sind gleichermaßen zur Transformation geeignet. So muss für jedes Objekt die ausgewogene Balance zwischen Zellbeschädigung, Eintrittstärke der Partikel und DNA-Freisetzung neu definiert werden.

Einzigartig bei dieser Transformationsmethode ist die Möglichkeit, für die Untersuchung gewebe- oder organspezifischer Expression die verschiedenen Ziele direkt zu transformieren. Es ist sogar gelungen, Chloroplasten von Algen (Boynton *et al.*, 1988) und höheren Pflanzen (Svab *et al.*, 1990) sowie Mitochondrien von Hefen (Johnston *et al.*, 1988) gezielt zu transformieren. Durch die hohe Kopienzahl der eingebrachten Gene kann schon nach wenigen Stunden bis Tagen ein Nachweis der transienten Fremdgen-Expression erbracht werden. Die DNA bleibt dabei weitgehend extrachromosomal und wird nach 1 bis 2 Wochen wieder abgebaut. Dieses Verfahren wird besonders zu Promotoranalysen und zur Lokalisierung von Biosynthesewegen genutzt. Zur Detektion der Genexpression werden Reportergene wie z. B. GUS oder GFP eingesetzt.

Für die Herstellung stabil transformierter Pflanzen werden regenerationsfähige Gewebe ausgewählt. Bei monokotylen Pflanzen, die früh nach der Embryogenese ihre Fähigkeit zur

Regeneration verlieren, sind dies bevorzugt Meristeme der Embryos. Auch bei Hülsenfrüchten und anderen schlecht regenerierenden Arten werden Meristeme verschiedenen Ursprungs eingesetzt. Im einfachsten Fall aber können Blätter beschossen werden. Durch diese Methode lassen sich langwierige Zellkulturstadien umgehen und aus dem regenerationsfähigen Gewebe unter entsprechender Selektion direkt transgene Pflanzen gewinnen. Dabei können mehrer Fremdgene eingebracht werden, die nicht auf demselben Plasmid liegen müssen. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass transformierte Linien nach Co-Transformation mit zwei Genen beide gleichzeitig exprimieren, unabhängig davon, ob sie auf einem oder zwei verschiedenen Plasmiden lagen (Christou, 1992).

2. Gentransfer in *H. perforatum*

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der pflanzlichen Gentechnik in den letzten 20 Jahren lassen sich heute bei weitem nicht alle Pflanzen problemlos transformieren. Viele Pflanzen, bei denen selbst die Methoden des direkten Gentransfers ohne Erfolg bleiben, zeigen nicht genügend Regenerationsvermögen oder halten den Bedingungen während der Transformation nicht stand. *H. perforatum* hingegen regeneriert aus differenziertem Gewebe auch nach mechanisch schroffer Behandlung. Die Schwierigkeiten bei der Erzeugung transgener Linien scheint also auf der Stufe des Gentransfers zu liegen. Wie die Versuche der Infektion mit *A. tumefaciens* und der Hemmtest zeigen konnten, wird das Wachstum der Bakterien von *H. perforatum* gehemmt. Die Agrobakterien breiten sich nicht in unmittelbarer Nähe von Pflanzenteilen und -Extrakten aus. Somit besteht keine Möglichkeit den für den T-DNA-Transfer nötigen Kontakt zwischen *H. perforatum* und *A. tumefaciens* überhaupt herzustellen.

Diese Hürde besteht beim direkten Gentransfer nicht, da die Fremd-DNA über die Goldpartikel in das Gewebe gelangt. Jedoch wird die eingebrachte DNA von *H. perforatum* nicht wie erwartet abgelesen. Mögliche Ursachen liegen im zeitlichen Geschehen des Zellzyklus, einer besonderen Fremdgen-Erkennung oder einer ausgeprägten Endonuklease-Aktivität. Für das Letztere wurden experimentelle Hinweise erhalten. Einzig die Zellkultur der *H. perforatum*-Varietät Helos zeigte nach direktem Gentransfer reproduzierbar transiente Fremdgen-Expression. Da dieses der erste Schritt zu einer stabilen

Transformation ist, gilt es nun die Experimente an dieser Varietät zu intensivieren und auch auf andere Kulturformen auszudehnen. Möglicherweise liegen bei den Varietäten Unterschiede im Inhaltsstoffspektrum vor, die ebenfalls den Erfolg der Transformation beeinflussen könnten.

In den vergangenen Jahren gelang es mehr und mehr Pflanzen zu transformieren, die lange als rekalcitrant galten. Darunter befinden sich wirtschaftlich bedeutende Getreide und Leguminosen sowie Bäume (z.B. Pappel). Da die Zahl dieser zunächst nicht transformierbaren Spezies ständig sinkt, sind viele Wissenschaftler der Ansicht, dass keine Pflanze sich tatsächlich durch molekulare Mechanismen oder andere Strategien der stabilen Transformation widersetzen kann. Es ist demnach nur eine Frage der Zeit und der Ausdauer der Wissenschaftler, bis ein Projekt Erfolg hat.

Tatsächlich ist kürzlich eine Transformations-Methode für *H. perforatum* publiziert worden (Vinterhalter *et al.*, 2006). Nach der Infektion von Sprossen mit *A. rhizogenes* A4M70GUS gelang es den Autoren histochemisch GUS-Aktivität zu zeigen und in einer PCR das GUS-Gen nachzuweisen. Allerdings blieb der endgültige Beweis der Integration des Fremdgens mit den eingangs aufgeführten Methoden bislang aus. Offen bleibt auch die Frage, worauf die Unterschiede zwischen *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* in der Empfindlichkeit gegenüber *H. perforatum* beruhen. Möglicherweise ist *A. rhizogenes* weniger sensitiv gegenüber den spezifischen Inhaltsstoffen des Johanniskrauts, Hyperforin und Hypericin.

3. Hyperforin und Hypericin

An der antidepressiven Wirkung von *Hypericum*-Präparaten sind Hyperforine, Hypericine und Flavonoide beteiligt (Butterweck, 2003). Als wichtigster und best untersuchter Inhaltsstoff gilt Hyperforin, ein strukturell wie funktionell neuartiges Antidepressivum (Müller *et al.*, 2003). Neben der depressionslindernden Wirkung besitzen Hyperforin und Hypericin weitere interessante Aktivitäten. So wirkt Hypericin phototoxisch, antimikrobiell und antiherbivor (Sirvent *et al.*, 2003). Außerdem besitzt es antivirale Eigenschaften, z.B. gegen Hepatitis C und HIV (Lavie *et al.*, 1989). Einzeln oder zusammen mit Hyperforin inhibiert es das Wachstum verschiedener Krebs-Zelllinien in

vitro durch dosisabhängige Induktion der Apoptose. Das Phloroglucinol Hyperforin stimuliert die Expression von Genen, die in tierischen und menschlichen Zellen an Vorgängen wie Zellteilung und Apoptose beteiligt sind (Quiney *et al.*, 2006). Es interagiert mit verschiedenen Enzymen, Transporterproteinen und Cofaktoren. Es wäre also denkbar, dass auch in der Pflanze selbst durch die vielfältigen Hyperforin-Wirkungen das Einbringen fremder DNA erschwert wird. Hinzu kommt, dass Hyperforin ausgeprägte antibakterielle Aktivität zeigt, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

3.1. Antibakterielle Wirkung von Hyperforin

Schon zu Beginn der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts konnte die antibakterielle Aktivität von *Hypericum*-Zubereitungen gegenüber gram-positiven Bakterien dem Hyperforin zugeordnet werden (Gurevich *et al.*, 1971). **Tab. 6** zeigt, welche minimalen inhibitorischen Konzentrationen für Bakterien und Pilze ermittelt wurden. Der Effekt auf gram-positive Bakterien tritt schon bei geringer Hyperforin-Konzentration auf. Die meisten getesteten Pilze und gram-negativen Bakterien wurden jedoch nicht vom Hyperforin beeinträchtigt. Bis jetzt wurde eine Wirksamkeit von *Hypericum*-Extrakten gegen gram-negative Bakterien nur in wenigen Fällen beschrieben (Gudžić *et al.*, 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Wirkung festgestellt. Es wurde zunächst beobachtet, dass die Agrobakterien nicht, wie aus anderen Transformationsexperimenten bekannt, nach der Infizierung die Explantate überwuchsen. Auch nach längerer Kultur traten die Bakterien nicht wieder in Erscheinung. Der Hemmtest zeigte dann endgültig eine zumindest wachstumshemmende Wirkung von Johanniskraut-Extrakt auf *Agrobacterium tumefaciens*.

Tab. 6: Antimikrobielle Aktivität von Hyperforin gegen Bakterien und Pilze (Reichling et al., 2001). MIC = minimale inhibitorische Konzentration.

Organismus	MIC (µg/ml)
Gram-positive Bakterien	
<i>Staphylococcus aureus</i> (multi-resistent)	0,1
<i>Sarcina lutea</i>	0,1
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2
<i>Bacillus mycoides</i>	0,2
<i>Mycobacterium phlei</i>	1,0
<i>Corynebacterium michiganes</i>	1,0
<i>Streptococcus faecalis</i>	1,0
Gram-negative Bakterien	
<i>Escherichia coli</i>	400,0
<i>Proteus vulgaris</i>	400,0
Pilze	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	400,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	400,0
<i>Mucor plumbeum</i>	400,0
<i>Candida albicans</i>	400,0

3.2. Hyperforin-Biosynthese in *Hypericum*-Arten

Pharmakologisch ist das Hyperforin bereits gut untersucht, doch die Biosynthese ist weitgehend unbekannt. In Zellkulturen von *H. calycinum* konnte die Aktivität der Isobutyrophenon-Synthase (BUS) durch die Arbeitsgruppe Beerhues nachgewiesen werden (Klingauf *et al.*, 2005). Das Enzym katalysiert die Kondensation von Isobutyryl-CoA mit drei Malonyl-CoA (**Abb. 6**). Als zweiter Inhaltsstoff entsteht in den Zellkulturen das Hyperforin-homologe Adhyperforin, welches in intakten Pflanzen von *H. perforatum* ebenfalls in kleinen Mengen vorkommt. In den von Klingauf *et al.* (2005) untersuchten Zellkulturen stellt jedoch Adhyperforin das Hauptprodukt dar, und Hyperforin wird nur in geringem Maße gebildet. Andere *Hypericum*-Arten zeigten in Zellkultur bislang keine Akkumulation von Hyperforinen. Die Aktivität der Isobutyrophenon-Synthase korreliert mit dem Wachstum und der Adhyperforin-Akkumulation der Zellkulturen. Acht Tage nach Subkultur konnte ein Maximum an Adhyperforin in den Zellen detektiert werden.

Neben der BUS sind weitere Enzyme an der Biosynthese des Hyperforins beteiligt. Das Phlorisobutyrophenon als Grundgerüst unterliegt mehreren Prenylierungsschritten bis zum Endprodukt (**Abb. 32**). Die letzte Prenylierungsreaktion geht wahrscheinlich mit der intramolekularen Zyklisierung zum Bizeklus einher. Die Aktivität der Prenyltransferasen wurde ebenfalls an *H. calycinum*-Zellkulturen untersucht. Nach der Zugabe von Phlorisobutyrophenon und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu zellfreien Extrakten aus drei Tage alten *H. calycinum*-Kulturen konnte ein enzymatisches Produkt mittels HPLC und GC-MS-Analyse detektiert und als Dimethylallylphlorisobutyrophenon identifiziert werden (Boubakir *et al.*, 2005). Die beteiligte Prenyltransferase akzeptiert DMAPP als Prenyldonor, zeigt jedoch keine Aktivität mit Geranylpyrophosphat (GPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP). Als Prenylakzeptor wird Phlorisobutyrophenon bevorzugt, aber auch Phloracetophenon kann prenyliert werden.

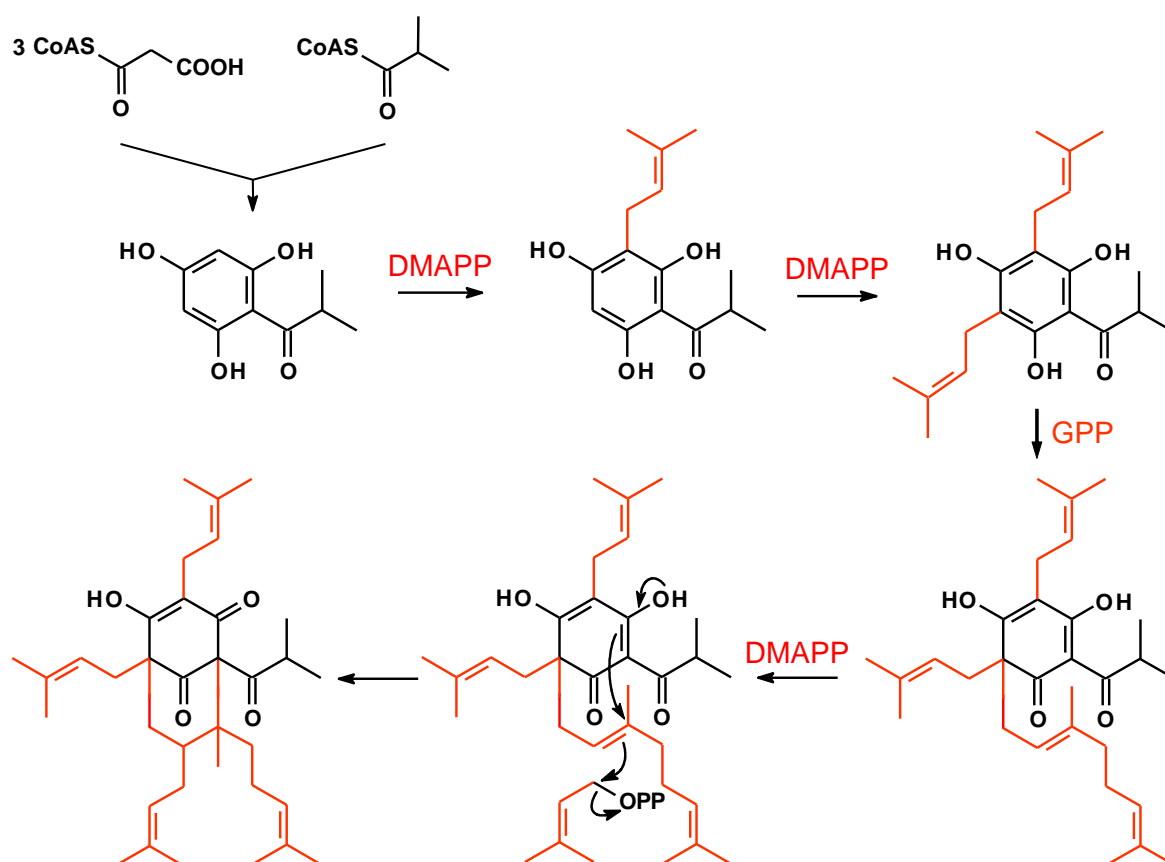


Abb. 32: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006)

3.3. Manipulation der Hyperforin-Biosynthese

Die chemische Totalsynthese des Hyperforins ist trotz großer Anstrengungen bisher fehlgeschlagen (Nicolaou *et al.*, 2005). Aber gerade die Kombination aus schwieriger chemischer Synthese und faszinierendem pharmakologischen Profil macht das Hyperforin zu einem interessanten Molekül für die biotechnologische Forschung. Durch eine stabile Transformation von *H. perforatum* eröffnet sich die Chance, den Biosyntheseweg des Hyperforins gezielt zu beeinflussen („metabolic engineering“). Bisher ist nur eine kleine Anzahl von Hyperforin-Derivaten bekannt, die auf halb-synthetischem Wege durch eher periphere Veränderungen am Hyperforin-Molekül dargestellt wurden (Verotta *et al.*, 2004). Alle diese Verbindungen zeigen aber im Neurotransmitter-Wiederaufnahme-Test ein schwächeres Hemmpotenzial als die Muttersubstanz. Veränderungen an der Grundstruktur des Hyperforins durch Semi-Synthese sind eher schwierig. Demgegenüber könnte der Eingriff in die Biosynthese zu massiveren Abwandlungen der Molekülstruktur führen. Ein Beispiel hierfür ist in **Abb. 8** gezeigt. Durch konstitutive Expression der Benzophenon-Synthase in transgenen Johanniskraut-Linien könnte das Phlorbenzophenon ubiquitär verfügbar sein und als Substrat für die involvierten Prenyltransferasen fungieren, woraus eine Hyperforin-analoge Substanz mit verändertem Grundgerüst resultieren könnte. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, in die Prenylierungsreaktionen einzugreifen, um z.B. die Kettenlänge der Prenylreste zu manipulieren oder partiell prenylierte Hyperforin-Derivate zu gewinnen. Kürzlich wurde in Sprosskulturen von *H. perforatum*, die auf einem NAA-haltigen Nährmedium wuchsen, die Bildung einer Hyperforin-homologen Verbindung beobachtet, bei der ein Prenylrest fehlt (Charchoglyan *et al.*, 2007). Letztlich müssen aber die pharmakologischen Prüfungen zeigen, ob die neuen Hyperforin-verwandten Moleküle bessere Eigenschaften als die Muttersubstanz besitzen, also entweder eine verbesserte Wirksamkeit und/oder weniger unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen. Dass dieses Ziel prinzipiell erreichbar ist, hat kürzlich die Semi-Synthese von Aristoforin gezeigt. Dieses *O*-Carboxymethyl-Derivat des Hyperforins ist stabiler und besser löslich als Hyperforin selbst und büßt dabei nicht dessen antitumorale Aktivität ein (Gartner *et al.*, 2005).

V. Zusammenfassung

- Die Arzneipflanze *Hypericum perforatum* L. (*Clusiaceae*) hat bei der Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen heute große Bedeutung. Die Wirksamkeit von Johanniskraut-Zubereitungen ist in vielen klinischen Studien belegt und mit der von synthetischen Antidepressiva vergleichbar. Das Nebenwirkungspotenzial ist aber geringer.
- Als Hauptwirkstoff gilt Hyperforin, ein mehrfach prenyliertes bizyklisches Acylphloroglucinol-Derivat, das in Blättern und vor allem Blüten und Früchten vorkommt. Seine antidepressive Wirkung beruht auf einer Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme verschiedener Neurotransmitter, z.B. Dopamin, Noradrenalin, Serotonin, L-Glutamat und GABA.
- Die Biosynthese des Hyperforins ist noch weitgehend ungeklärt. Lediglich die Synthese des Grundgerüsts, katalysiert durch die Isobutyrophenon-Synthase (BUS), und die erste Prenylierungsreaktion, katalysiert durch eine Dimethylallyltransferase, sind biochemisch aufgeklärt.
- Die chemische Totalsynthese des Hyperforins ist bislang nicht gelungen. Daher wird angestrebt, die Biosynthese des Hyperforins auf gentechnologischem Wege zu manipulieren („metabolic engineering“). Dies könnte zur Bildung Hyperforin-ähnlicher Moleküle führen.
- Für viele dikotyle Pflanzen liefert die Genübertragung mittels Agrobakterien stabile Transformanten bei relativ geringem technischen Aufwand. Ferner erfolgt die Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom in einer kleinen Kopienzahl. Für *H. perforatum* jedoch konnte eine Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* auch nach vielen Versuchen unter modifizierten Kultivierungsbedingungen und mit unterschiedlichem Ausgangsmaterial nicht erzielt werden. Ein Hemmtest zeigte, dass die Pflanze antibiotisch gegen die gram-negativen Bakterien wirkt.
- Die Isolation und Transformation von Protoplasten aus *H. perforatum*-Sprosskulturen war ebenfalls nicht erfolgreich. Die wenigen freigesetzten Protoplasten zeigten nach der PEG-vermittelten Transformation keine Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).
- Als weitere Methode erfolgte der Beschuss des Pflanzenmaterials mit DNA-überzogenen Goldpartikeln. Bei diesem direkten Gentransfer lässt sich prinzipiell eine

transiente Expression schon wenige Stunden nach der Transformation im Zielgewebe nachweisen. In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Proteine als Reporter eingesetzt.

- Die Expression eines Fusionsgens aus Benzophenon-Synthase (BPS) und GFP konnte im Cytoplasma von *Nicotiana tabacum*-Blatzellen, jedoch nicht in solchen von *H. perforatum* beobachtet werden. Die BPS ist wie die BUS eine Polyketid-Synthase und katalysiert die Bildung des Grundgerüsts von Benzophenon-Derivaten.
- In Wildtyp-Blättern von *H. perforatum* gelang es nur in einem einzigen Transformationsansatz, die Expression eines GFP-PTS1-Konstrukts zu detektieren. Demgegenüber wurden Zellen einer Suspensionskultur der *H. perforatum*-Varietät Helos reproduzierbar transient transformiert. Bisläng aber gelang daraus nicht die Regeneration transgener Pflanzen, obwohl aus untransformierten Zellen intakte Sprosse gebildet werden konnten.

VI. Anhang

1. Basensequenz der Benzophenon-Synthase aus *H. androsaemum*

```
1 atggccccgg cgatggagta ctcaaccag aacggccagg gggagggaaa gaagagagct
61 agtgtcctcg ctattggaac aaccaaccg gaacatttca tcttgcagga ggactacccc
121 gacttctact tcaggaacac caacagcgag cacatgaccg agctcaagga gaaattttaa
181 cgtatctgtg ttaagtctca tattaggaag aggcacttct acctaaccga ggagattctc
241 aaggagaacc aggggatcgc cacctatggc gcgggctccc ttgacgcccg ccagaggatc
301 ctcgagaccg aggtcccga gctgggtcag gaggcggccc tcaaagccat cgcggagtgg
361 ggccagccca tctccaagat aacacacgtg gtgttcgcga cgacctccg gttcatgatg
421 cccggggcag actacgtcat caccgcctc ctccgcctca accgcaccgt caggcgcgctc
481 atgctctaca accagggctg cttecgctggg ggcacggccc tccgtgtcgc caaggacctc
541 gcggagaaca acgagggcgc gcgctgtctc gtctgtgtgc cggagaacac cgccatgact
601 ttccacgccc ccaacgagtc ccacctagac gtgatcgtgg ggcaagccat gttctcagat
661 ggcgcggctg ctctgatcat cggggcatgc cctgacgttg cttctgggga gcgcgcagtg
721 ttcaatatcc tgtcggcgag ccagacgatc gtgccgggct ccgacggggc gataacggcg
781 cacttctacg agatggggat gagctacttc cttaaggagg acgtcatccc tctcttccgt
841 gataacatcg ccgccgtcat ggaggaggcc ttctctccgc ttgggggtctc cgactggaac
901 tccctcttct actccatcca ccccgtggc cgagggatca tcgacggcgt cgccgggaac
961 cttgggatca aggacgagaa ccttgtggcg accaggcacg tcctcggcga gtacgggaac
1021 atgggggtcag cctgcgtgat gttcatcctt gacgagctta ggaagagctc caaggtcaac
1081 gggaagccca ccaccggcga cggcaaggag ttcggtgccc tcacggcctt cggccctggc
1141 ctcaccgtgg aagccgtcgt cctccagagt gtcccaattc tccagtga
```

2. Ergebnis der Sequenzierung des Fusionsgens BPS-GFP

Sequenzierungsergebnis der Fusion BPS-GFP mit dem Primer T7:

```
1 ccatggcccc ggcgatggag tactcaacc agaacggcca gggggagggg aagaagagag
61 ctagtgtcct cgctattgga acaaccaacc cggaacattt catcttgcag gaggactacc
121 ccgacttcta cttcaggaac accaacngcg agcacatgac cgagctcaag gagaaattta
181 aacgtatctg tgtaagtct catattagga agaggcactt ctacctaacc gaggagattc
241 tcaaggagaa ccaggggatc gccacctatg gcgcgggctc ccttgacgcc cgccagagga
301 tcctcgagac cgaggtcccg aagctgggtc aggaggcggc cctcaaagcc atcgcgaggt
361 ggggccagcc catctccaag ataacacacg tgggtgttcgc gacgacctcc gggttcatga
421 tgcccggggc agactacgtc atcaccgcc tcctcggcct caaccgcacc gtcaggcgcg
481 tcatgctcta caaccagggc tgcttcgctg ggggcacggc cctccgtgtc gccaggacc
541 tcgcgagaaa caacgagggc gcgcgcgc
```

Sequenzierung der BPS-GFP-C-Fusion mit dem Primer SP6:

```

1 tagatcttca ctggagaatt gggacactct ggaggacgac ggcttccacg gtgaggccag
61 ggccgaggcc gatgaggcag ccgaactcct tgccgtcgcc ggtggtgggc ttcccgttga
121 ccttggagct cttcctaagc tcgtcaagga tgaacatcac gcaggctgac cccatgttcc
181 cgtactcgcc gaggacgtgc ctggtcgcca caagggttctc gtccttgatc ccaagggttcc
241 cggcgacgcc gtcgatgac cctcggccac cggggtggat ggagtagaag agggagttcc
301 agtcggagac cccaagcgga gagaaggcct cctccatgac ggcggcgatg ttatcacgga
361 agagagggat gacgtcctcc ttaaggaagt agctcatccc catctcgtag aagtgcgccg
421 ttatcgcccc gtcggagccc ggcacgatcg tctggctcgc cgacaggata ttgaacactg
481 cgcgctcccc agaagcaacg tcagggcatg ccccgatgat cagagcagcc gcgccatctg
541 agaacatggc ttgccccacg atcacgtcta ggtgggactc gttgggggcg tggaaagtca
601 tggcgggtgtt ctccgcgcac acgacgagca cgcgcgcgcc ctcgttgttc tccgcgaggt
661 ccttggcgac acggagggcc gtgccccag cgaagcagcc ctggttgtag agcatgacgc
721 gcctgacggg gcggttgagg ccgaggaggc gggatgatgac gtagtctgcc ccgggcatca
781 tgaaccggga ggtcgtcgcg aaacaccact tgtgttatct tggagatgg ggctggcccc
841 cactccgcga atggcttttg agggcgggcc ctccggacc ccagctttcg gggaccttcg
901 gttctcgagg gatccccctg gcggggcgtc aaaggaagc ccccgcc

```

Sequenzierung der BPS-GFP-N-Fusion mit SP6:

```

1 tagatcttcc ctggagaatt gggacactct ggaggacgac ggcttccacg gtgaggccag
61 ggccgaggcc gatgaggcag ccgaactcct tgccgtcgcc ggtggtgggc ttcccgttga
121 ccttggagct cttcctaagc tcgtcaagga tgaacatcac gcaggctgac cccatgttcc
181 cgtactcgcc gaggacgtgc ctggtcgcca caagggttctc gtccttgatc ccaagggttcc
241 cggcgacgcc gtcgatgac cctcggccac cggggtggat ggagtagaag agggagttcc
301 agtcggagac cccaagcgga gagaaggcct cctccatgac ggcggcgatg ttatcacgga
361 agagagggat gacgtcctcc ttaaggaagt agctcatccc catctcgtag aagtgcgccg
421 ttatcgcccc gtcggagccc ggcacgatcg tctggctcgc cgacaggata ttgaacactg
481 cgcgctcccc agaagcaacg tcagggcatg ccccgatgat cagagcagcc gcgccatctg
541 agaacatggc ttgccccacg atcacgtcta ggtgggactc gttgggggcg tggaaagtca
601 tggcgggtgtt ctccgcgcac acgacgagca cgcgcgcgcc ctcgttgttc tccgcgaggt
661 ccttggcgac acggagggcc gtgccccag cgaagcagcc ctggttgtag agcatgacgc
721 gcctgacggg gcggttgagg ccgaggaggc gggatgatgac ccgggcatca tgaaccggga
781 ggtcgtcgcg aaacaccact tgtgttatct tggagatgg ggctggcccc cactccgcga
841 atg

```

VII. Literatur

- Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., de Witte P.A. 2002:** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 221-241
- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I. Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. 2003:** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Anderson A., Moore L. 1979:** Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69:320-23
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977:** DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467
- Balasubramanaym K., Altaf M., Varier R. A., Swaminathan V., Ravindran A., Sadhale P. P., Kundu T. K. 2004:** Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem.* 279 (49): 51163-51171
- Ballas N., Citovsky V. 1997:** Nuclear localisation signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10723-10728
- Beerhues L. 2006:** Molecules of interest - Hyperforin. *Phytochemistry* 67: 2201-2207
- Beerhues L., Abd El-Mawla A., Beuerle T., Boubakir Z., Klingauf P., Liu B. 2005:** Biosynthesis of active plant polyketide derivatives. 9th International Congress "Phytopharm 2005" and PSE Young Scientists Meeting on "Plants and Health"
- Biber A., Fischer H., Römer A., Chatterjee S. S. 1998:** Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl 1), 36-43
- Boubakir Z., Beuerle T., Liu B., Beerhues L. 2005:** The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry* 66:51-57

- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Holser J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C. 1988:** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high-velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1538
- Bradford M. 1976:** A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 245-248
- Butterweck V., 2003:** Mechanism of action of St. John's wort in depression. *CNS Drugs* 17, 539-562. *Cell Physiol.* 45:12 2004
- Chalfi M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994:** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- Charchoglyan A., Abrahamyan A., Fujii I., Boubakir Z., Gulder T. A. M., Kutchan T. M., Vardapetyan H., Bringmann G., Ebizuka Y., Beerhues L. 2007:** Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissues is suggestive of a metabolic branch point. *eingereicht*
- Chatterjee S. S., Bhattacharya S. K., Wonnemann M., Singer A., Müller W. E. 1998:** Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* 63 (6), 499-510
- Chatterjee S. S., Biber A., Weibezahn C. 2001:** Stimulation of Glutamate, Aspartate and Gamma-Aminobutyric Acid Release from Synaptosomes by Hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1), 11-19
- Chen S., Jin W., Wang M., Zhang F., Zhou J., Jia Q., Wu Y., Liu F., Wu P. 2003:** Distribution and characterization of over 100 T-DNA tags in rice genome. *Plant J.* 36: 105-113
- Christou P. 1992:** Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal* 2 (3): 275-281
- Christou P., Ford T., Kofron M. 1991:** Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Tech.* 9:957-962
- Citovsky V., Guralnick B., Simon M. N., Wall J. S. 1997:** The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import. *J. Mol. Biol.* 271:718-727
- Cormack B. P., Valdivia R., Falkow S. 1996:** FACS-optimized mutants of green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173 : 33-38

- Czygan F.-C. 1993:** Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Zeitschrift für Phytotherapie* 14, 272-278
- De la Riva A. G., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. 1998:** *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 07173458
- Del Sal G., Manifioletti, Schneider C. 1989:** The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmid suitable for sequencing. *Bio. Techniques* 7 (5): 514-519
- Deng W., Chen L., Wood D. W., Metcalfe T., Liang X., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W. 1998:** *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7040-7045
- Diwu Z. 1995:** Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem. Photobiol.* 61, 529-539
- Fromm M. E., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J., Klein T. M. 1990:** Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Tech.* 8:833-844
- Gartner M., Müller T., Simon J. C., Giannis A., Sleeman J. P. 2005:** Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. *Chem Bio Chem* 6: 171-177
- Gelvin S. B. 2000:** *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:223-56
- Gelvin S. B. 2003:** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2003, 16-37
- Gheysen G., Villarroel R., Van Montagu M. 1991:** Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Development* 5:287-297
- Gudžić B., Nedeljković J. M., Đorđević S., Čomor J.J. 1997:** Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Hyperici* herb (*Hypericum perforatum* L.) from Vlasina region. *Facta Universitatis, Physics, Chemistry and Technology* Vol.1, No.4: 47-51
- Gurevich A. L., Dobrynin V. N., Kolosov M. N., Popravka, Ryabova I. D., Chernov B. K., Derbentseva N. A., Aizenman B. E., Gargulya A. D. 1971:** Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum*. *Antibiotiki* (Moscow) 16:510-513

- Hadjur C., Richard M.J., Parat M.O., Favier A., Jardon P. 1995:** Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. *J Photochem Photobiol Biol*, 27:139-146
- Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y. 1994:** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 20; 91 (26): 12501-12504
- Hölzl J. und Ostrowski E. 1987:** Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). *Deutsche Apotheker Zeitung* 23: 1227-1230
- Hölzl J. und Schütt H. 1994:** Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharmaz. Zeitung* 46: 3959-3977
- Hörnig M. und Meyer-Wegener J. 1998:** Johanniskraut-Licht im Dunkel der Depression. Mosaik Verlag GmbH, München
- Jin S., Prusti R. K., Roitsch T., Ankenbauer R. G., Nester E. W. 1990:** Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J. Bacteriol.* 172:4945-4950
- Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K., Sanford J.C., Butow R.A. 1988:** Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240:1538-1541
- Jorgensen R., Snyder C., Jones J. D. G. 1987:** T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207:471-477
- Ke J., Kahn R., Johnson T., Somers D. A., Das A. 2001:** High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 20:150-156
- Kerb R., Brockmöller J., Staffeldt B., Ploch M., Roots I. 1996:** Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin. *Antimicrob Ag Chemother* 40, 2087-2093
- Klingauf P., Beuerle T., Mellenthin A., El-Moghazy S.A.M, Boubakir Z., Beerhues L. 2005:** Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* 66:139-145
- Lacroix B., Li J., Tzfira T., Citovsky V. 2006:** Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 333-345

- Lavie G., Valantine F., Levin B., Mazur Y., Gallo G., Lavie D., Weiner D., Meruelo D. 1989:** Studies of the mechanism of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 5963-5967
- Li J., Vaidya M., White C., Vainstein A., Citovsky V., Tzfira T. 2005:** Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (52): 19231-19236
- Liu B., Falkenstein-Paul H., Schmidt W., Beerhues L. 2003:** Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant Journal* 34, 847-855
- Mathijssen R. H. J., Verweij J., de Bruijn P., Loos W. J., Sparrenboom A. 2002:** Effects of St. John's wort on irinotecan metabolism. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 1247-1249
- Matsumoto K., Akao Y., Kobayashi E., Ohquichi K., Ito T., Tanaka T., Iinuma M., Nozawa Y. 2003:** Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukaemia cell lines. *J Nat Prod.* 66(8) : 1124-1127
- Meins F. 2000:** RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol.* 43:261-273
- Meruelo D., Lavie D., Lavie E. 1989:** Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses. Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5230-5234
- Moore L. B., Goodwin B., Jones S. A., Wisleey G. B., Serabjit-Singh C. J., Willson T. M., Collins J. L., Klierer S. A. 2000:** St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *PNAS* 97, 7500-7502
- Müller W. E., Rolli M., Schafer C., Hafner U. 1997:** Effects of *Hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30, 102-107
- Murashige T. und Skoog F. 1962:** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479
- Nam J., Mysore K.S., Zheng C., Knue M. K., Matthyse G., Gelvin S. B. 1999:** Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 261:429-438
- Nicolaou K. C., Carenzi G. E. A., Jeso V. 2005:** Construction of highly functionalized medium-sized rings: Synthesis of hyperforin and perforatumone model systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 101-109

- Noldner M. und Schotz K. 2002:** Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med.* 68 (7): 577-580
- Nowak K., Luniak N., Meyer S., Schulze J., Mendel R. R., Hänsch R. 2004:** Fluorescent proteins in poplar: A useful tool to study promoter function and protein localization. *Plant Biology* 6:1-9
- Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. 1996:** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395
- Pan S.Q., Charles T., Jin S., Wu Z.L., Nester E. W. 1993:** Performed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-Agrobacterium signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:9939-9943
- Philipp M., Kohnen R., Hiller K. O. 1999:** Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression randomised multicentre study of treatment for eight weeks. *BMJ.* 1999 Dec 11;319(7224):1534-8. Erratum in: *BMJ* 2000 Feb 5;320(7231):361.
- Piscitelli S. C., Burstein A. H., Chait D., Alfaro R. M., Falloon J. 2000:** Indinavir concentrations and St. John's wort. *Lancet* 355: 547-548
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prednargast F. G., Cormier M. J. 1992:** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 15; 111 (2): 229-233
- Quiney C., Billard C., Salanoubat C., Fourneron J D., Kolb J. P. 2006:** Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? *Leukemia* 20, 1519-1525
- Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., Maas C. 1996:** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11; 93 (12): 5888-5893
- Reichling J., Weseler A., Saller R. 2001:** A Current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl 1), 116-118
- Ritchie S. W., Lui C.-N., Sellmer J. C., Kononowicz, Hodges T. K. H., Gelvin, S.B. 1993:** Agrobacterium tumefaciens-mediated expression of gusA in maize tissue. *Transgenic Res.* 2:252-265

- Rossi L., Hohn B., Tinland B. 1993:** The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants. *Mol. Gen. Genet.* 239:345-353
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989:** Molecular cloning, a laboratory manual, 2 nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* (CSH) New York
- Sanford J. C. 1988:** The biolistic process. *Tibtech* 6:299-302
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977:** DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Schempp C. M., Windeck T., Hezel S., Simon J. C. 2003:** Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomised, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 10 (4): 31-37
- Schempp C.M., Müller K. A., Winghofer B., Schöpf E., Simon J. C. 2002:** Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) Eine Pflanze mit Relevanz für die Dermatologie. *Hautarzt* 53, 316-321
- Schempp C.M., Pelz K., Wottmer A., Schöpf E., Simon L.C., 1999:** Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 353:2129
- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Y. 1962:** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59, 223-239
- Sirvent T. M., Krasnoff S. B., Gibson D. M. 2003:** Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 29, 12: 2667-2681
- Steinbiß H-H. 1995:** Transgene Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag
- Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, et al., 1984:** Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 50, 272-274
- Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. 1990:** Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 87:8526-8530
- Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V, Bravo A. M., Angel M., Hohn B. 1995:**The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protien is responsible for precise integration of T-DNA into plant genome. *EMBO Journal* 14:3585-3595
- Van Wordragen M. F. und Dons H. J. M. 1992:** *Agrobacterium tumafaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:12-36

- Vandenbogaerde A. L., Delaey E. M., Vantiegem A. M., Himpens B. E., Merlevede W. J., De Witte P. A. 1998:** Cytotoxicity and antiproliferative effects of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem Photobiol.* 67, 119-125
- Vasil V., Brown S. M., Re D., Fromm M. E., Vasil I. K. 1991:** Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* 9: 743-747
- Verotta L., Lovaglio E., Sterner O., Appendin, G., Bombardelli E., 2004:** Oxidative fragmentation of the bridged β -triketone core of hyperforin. *Eur. J. Org. Chem.*, 1193-1197.
- Villemont E., Dubois F., Sangwan R. S., Vasseur G.,Bourgeois Y., Sangwan-Norrel B.S. 1997:** Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201: 160-172
- Vinterhalter B., Ninković S., Cingel A., Vinterhalter D. 2006:** Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biol. Plant.* 50 (4):767-770
- Vorbach E. U., Arnoldt K. H., Hubner W. D. 1997:** Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl. 2, 81-85
- Wheatley D. 1997:** LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients - a controlled 6-week clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 20 Suppl. 2, 77-80
- Yang F., Moss L. G., Phillips G. N. 1996:** The molecular structure of the green fluorescent protein. *Nature Biotechnol.* 14: 1246-1251
- Zupan J., Muth T. M., Draper O., Zambryski P. 2000:** The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23 (1):11-28

Lebenslauf

Nora Feye

Geboren am 21.04.1975 in Stadthagen

Schulbildung:	1981 - 85	Grundschule Isernhagen
	1985 - 87	Orientierungsstufe Isernhagen
	1987 - 91	Gymnasium Isernhagen
	1991 - 94	Käthe-Kollwitz-Schule in Hannover
	10.06.94	Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife
Berufsausbildung:	12.1994 - 09.1995	Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Tierklinik Dr. Dankert in Burgwedel
Studium:	1995 - 97	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
	10.1997	Immatrikulation an der Technischen Universität Braunschweig im Diplom- Studiengang Biologie
	31.10.2002	Abgabe der Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie (Abteilung Mendel)
	06.12.2002	Abschluss mit Diplom
Promotion:	11.2002 - 12.2006	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Biologie
	13.06.2007	Abschluss der Promotion mit der mündlichen Prüfung (Disputation)